



## Διπλωματική Εργασία

Έκφραση και ενζυμική δραστικότητα των ενζύμων, S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης (γ- GCL) σε ιστούς (καρδιά, μυς, εγκέφαλος) προβάτων, μετά από τη χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης.



**Assessment of Protein Expression and Enzymatic Activity of Glutathione S-Transferase (GST), Superoxide Dismutase (SOD) and gamma-Glutamylcysteine Synthetase (γ-GCL) in Lamb tissues (heart, muscle, brain) after Administration of feed supplemented with Grape Pomace.**

Μυλωνά Αθηνά

Λάρισα 2018

## *Τριμελής Επιτροπή*

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

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

**Χαρουτουγιάν Σέρκος:** Καθηγητής Χημείας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών- Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα.

Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και να μου λύσει οποιαδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα πραγματοποιήση των πειραμάτων μου.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Μακρή Σωτηρία, η οποία εκτελεί το διδακτορικό της πρόγραμμα, και τα δείγματα που χρησιμοποίησα για να εκτελέσω τα πειράματά μου, προήλθαν από το δικό της πρόγραμμα. Η κυρία Μακρή με συμβούλευε και με στήριζε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και χωρίς τις συμβουλές και τις γνώσεις της δεν θα είχα φτάσει στο τέλος της εκπόνησης αυτής τη εργασίας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή τους διδάκτορες Κωνσταντίνο Γερασόπουλο, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Υπάτιο Σπανίδη και Κούκα Παρασκευή, οι οποίοι με τις συμβουλές και την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος για αυτό και τους αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία.

## Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι τεσσάρων (24) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα-grape pomace, GP). Τα είκοσι τέσσερα (24) πρόβατα που εκτράφηκαν (12 σε κάθε στιγμή δειγματοληψίας) χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (6 σε κάθε ομάδα), στις οποίες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και λάμβανε το κοινό σιτηρέσιο, ενώ η δεύτερη αποτελούνταν από τα νεαρά πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων, προστέθηκαν στέμφυλα (GP), που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, με στόχο τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης τους. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση της υπεροξειδική δισμουτάσης (SOD) και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ- GCL) μεταξύ των δύο ομάδων. Το πειραματικό πλάνο διήρκησε 70 ημέρες εκ των οποίων, στις πρώτες 15 τα ζώα παρέμειναν με τις μητέρες τους και τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα, ενώ από εκεί και μετά χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (control & GP) και μέχρι τις 42 ημέρες τρέφονταν εκτός από γάλα και με τα δυο πειραματικά σιτηρέσια αντίστοιχα. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα μέχρι και την εβδομηκοστή (70) ημέρα από τη γέννηση τους, όπου τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με το πειραματικό σιτηρέσιο. Πραγματοποιήθηκαν ιστοληψίες σε δυο χρονικές στιγμές, 42 και 70 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία τους. Στην GP ομάδα, στον ιστό του εγκεφάλου, τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της GST στις 70 ημέρες μετά τη γέννηση. Αυξήθηκε, επίσης σημαντικά η δραστηριότητα της SOD, ενώ μειώθηκαν τα επίπεδα της γ- GCL στις 42 ημέρες. Στον ιστό του τετρακέφαλου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της GST και στις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες), καθώς και σημαντικά αυξημένα επίπεδα της γ- GCL στις 70 ημέρες για την πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν πως στην GP ομάδα, στον ιστό της καρδιάς αυξήθηκε σημαντικά η δραστηριότητα της SOD στις 70 ημέρες. Επομένως, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου τα αποτελέσματα αυτά ενίσχυσαν τη θεωρία πως ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υποπροϊόντα οινοποίησης παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση που βελτιώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ των προβάτων.

## Abstract

In this thesis, twenty-four lambs from Greek race “Chios” were used in order to determine the antioxidant activity of their feed supplemented with polyphenolic additives from wine processing (grape pomace-GP), until the stage of ab lactation. The twenty-four lambs (12 at each samplement moment) were divided into 2 groups (6 animals in each group). The first group (control group) was fed with standard ratio and the second group (GP group) included animals that received feed supplemented with GP, which is rich in polyphenols, in order to determine the enzymatic activity of GST, SOD and  $\gamma$ -GCL protein expression between two groups. The experimental plan lasted for 70 days. Following an initial 15 day period where the lamps remained with their ewes and they were only fed with breast milk, they were divided into two groups (control & GP) and fed with milk and two experimental feeds (standard and GP) until 42 days post birth. Sequentially, up to 70 days post birth, lamps were separated from their mothers and they have access only in two experimental feed (standard and GP). Tissues, such as heart, brain and quadriceps muscle were collected at 42 and 70 days post birth to assess the effect of bio-functional feed on their welfare.

Results showed that, at 42 days post-birth, GST activity was significantly increased only in quadriceps muscle, and significantly decreased in heart tissue, while there was no effect in brain in GP group compared to control. At day 70, GST was significantly increased in brain and quadriceps muscle and decreased in heart between two groups. SOD activity was significantly increased in heart both at two sampling times, and in brain only at 42 day in polyphenolic group compared to control, while in this tissue SOD was significantly decreased at 70 day. In quadriceps muscle, SOD levels were not affected from experimental feed.  $\gamma$ - GCL expression was significantly decreased at 42 days post- birth only in brain tissue, while in other tissues there was no effect between two groups. At 70 day,  $\gamma$ -GCL expression was significantly increased only at quadriceps muscle, after GP administration. Thus, consistent with previous studies from our laboratory these results reinforced the theory that polyphenolic additives derived from grape pomace show increased antioxidant activity that enhances lambs redox status.

## Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
1.  Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.1.  Δραστικές μορφές οξυγόνου- Τι είναι και πώς παράγονται.....	9
1.2.  Οξειδωτικό στρες .....	12
1.3.  Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	13
1.4.  Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά.....	17
1.4.1.  Υπεροξειδική Δισμουτάση SOD.....	17
1.4.2.  S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) .....	18
1.4.3.  Συνθετάση της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης ή λιγάση γλουταμική κυστεΐνης ( γ- GCL).....	19
2.  Πολυφαινόλες.....	22
2.1.  Βιοσύνθεση- Τάξεις .....	23
2.2.  Πολυφαινόλες στο φαγητό .....	28
2.3.  Αντιοξειδωτική Δράση.....	29
3.  Οίνος.....	30
3.1.  Ιστορικά.....	31
3.2.  Πολυφαινόλες στον οίνο .....	32
3.2.1.  Η θέση των φαιολικών συστατικών στο σταφύλι.....	33
3.3.  Οινοποίηση.....	34
3.3.1.  Συγκομιδή .....	34
3.3.2.  Θραύση.....	35
3.3.3.  Ο διαχωρισμός του χυμού .....	35
3.3.4.  Κατεργασία του μούστου.....	36
3.3.5.  Ζύμωση.....	36
3.3.6.  Επεξεργασία μετά τη ζύμωση.....	38
3.3.7.  Διαχωρισμός.....	38
3.3.8.  Εξευγενισμός.....	38
3.3.9.  Διήθηση .....	39
3.3.10.  Φυγοκέντριση .....	39
3.3.11.  Ψύξη.....	39
3.3.12.  Θέρμανση .....	39
3.4.  Υποπροϊόντα Οινοποίησης.....	40
4.  Πρόβια Μοντέλα .....	42
4.1.  Εγκυμοσύνη.....	42
4.2.  Χιώτικο Πρόβιατο .....	43
5.  Βιολειτουργικές Ζωοτροφές.....	44

<b>Β. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	46
<b>Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	47
1. Πειραματικός Σχεδιασμός .....	47
2. Παραγωγή Σιτηρεσίου .....	48
2.1. Ενσίρωση.....	48
2.1.1. Φάσεις Ενσίρωσης.....	49
2.1.2. Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος .....	51
3. Πειραματικά Πρωτόκολλα .....	52
3.1. Ομογενοποίηση Ιστών .....	52
3.2. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικού Περιεχομένου- Bradford.....	52
3.3. Προσδιορισμός δραστικότητας GST .....	53
3.4. Προσδιορισμός δραστικότητας SOD .....	53
<b>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	61
1. Δραστικότητα της GST.....	61
1.1. Ιστός Καρδιάς .....	61
1.2. Τετρακέφαλος Μυς.....	62
1.3. Ιστός Εγκεφάλου.....	62
2. Δραστικότητα της SOD.....	63
2.1. Ιστός Καρδιάς .....	63
2.2. Τετρακέφαλος Μυς.....	64
2.3. Ιστός Εγκεφάλου.....	64
3. Προσδιορισμός της γ- GCL .....	65
3.1. Ιστός καρδιάς .....	65
3.2. Ιστός Εγκεφάλου.....	66
3.3. Τετρακέφαλος μυς .....	67
<b>Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	68
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	72

# Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Ελεύθερες ρίζες

Το άτομο είναι το μικρότερο σωματίδιο ενός χημικού στοιχείου, το οποίο διατηρεί τις ιδιότητές του, με την έννοια ότι παραμένει αμετάβλητο κατά την εξέλιξη ενός χημικού φαινομένου (χημική αντίδραση).

Όλα τα άτομα, εκτός του "πρώτιου" που είναι ισότοπο του χημικού στοιχείου "υδρογόνο" και δεν έχει νετρόνια, αποτελούνται από τρεις τύπους υποατομικών σωματιδίων τα οποία διέπουν τις ιδιότητες των πρώτων:

- *ηλεκτρόνια*, τα οποία έχουν αρνητικό φορτίο και έχουν τη μικρότερη μάζα.
- *πρωτόνια*, τα οποία έχουν θετικό φορτίο και έχουν μάζα περίπου 1836 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων και
- *νετρόνια*, τα οποία δε φέρουν φορτίο και έχουν μάζα περίπου 1838 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων

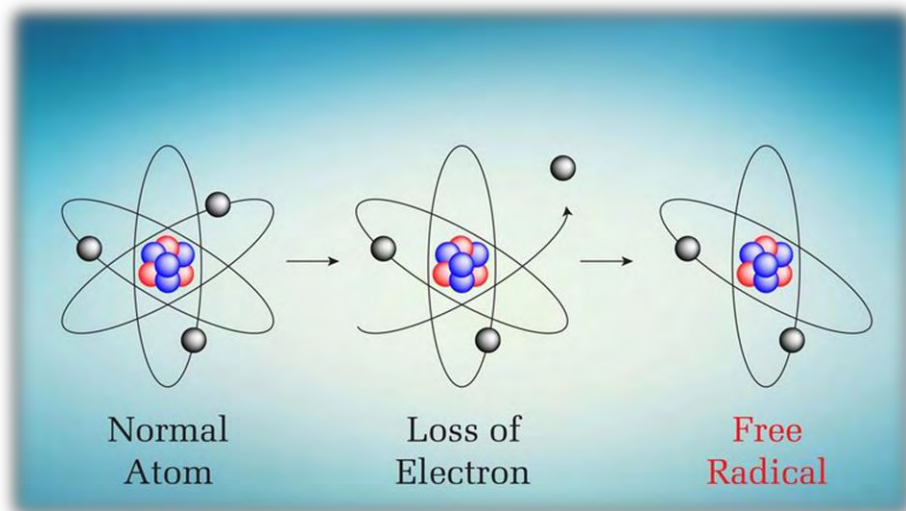
Η χημική συμπεριφορά των ατόμων οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια των ατόμων παραμένουν σε προβλέψιμες ηλεκτρονιακές δομές διευθετημένα σε ζεύγη. Αυτές οι δομές καθορίζονται από τη κβαντομηχανική συμπεριφορά των ηλεκτρονίων μέσα στο δυναμικό του πυρήνα. Ο κύριος κβαντικός αριθμός καθορίζει συγκεκριμένους ηλεκτρονιακούς φλοιούς (ή αλλιώς στοιβάδες) συγκεκριμένης ενέργειας η κάθε μία. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ενέργεια ενός φλοιού τόσο πιο μακριά βρίσκεται από τον πυρήνα.

Τα ηλεκτρόνια στον εξώτατο φλοιό ονομάζονται ηλεκτρόνια σθένους και έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην χημική συμπεριφορά του ατόμου, επειδή μπορούν εύκολα να σχηματίσουν χημικούς δεσμούς.

Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό.

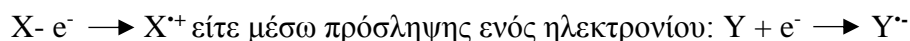
Άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια μπορούν να οριστούν ως ελεύθερες ρίζες. Η παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων καθιστά το μόριο ασταθές, με μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να ελκύει ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις).





Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας όταν ένα άτομο «χάνει», υπό ορισμένες συνθήκες, ένα ηλεκτρόνιο από την εξωτερική στοιβάδα.

Στα ζωντανά συστήματα υπάρχουν πολλές ελεύθερες ρίζες, όμως τα περισσότερα μόρια *in vivo* είναι μη- ριζικά. Οι ρίζες μπορούν να σχηματιστούν μέσω απώλειας ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο μη- ρίζα, αφήνοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και θετικό φορτίο:



Μπορούν, επίσης, να σχηματιστούν όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός, οπότε μένει ένα ηλεκτρόνιο από το ζεύγος του δεσμού σε κάθε άτομο (Halliwell B. et al., 2015).

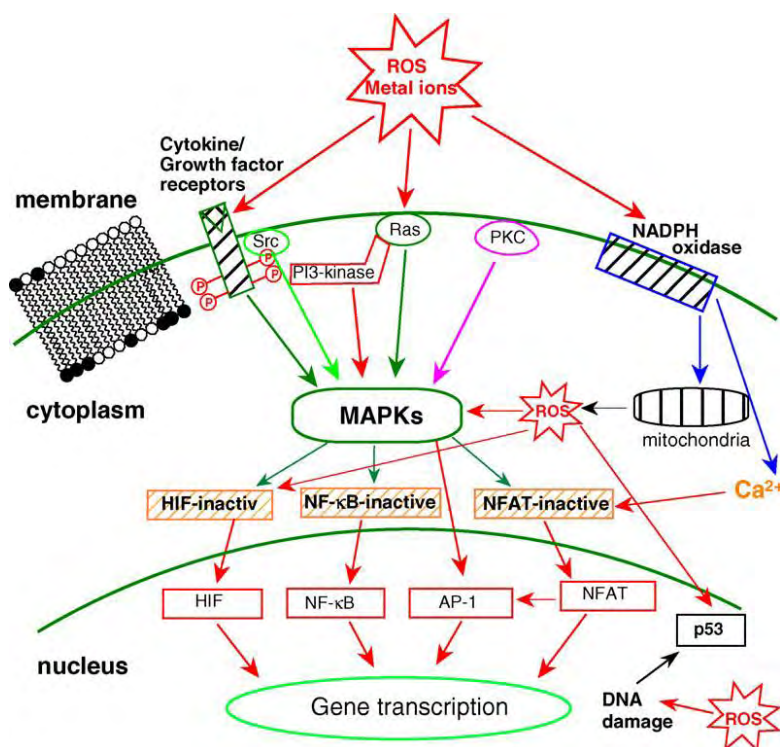
Έχει αποδειχθεί πλέον πως οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν παράγοντες που συμμετέχουν ενεργά σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών. Για παράδειγμα, συμπεριλαμβάνονται στους ρυθμιστές κύριων μεταβολικών μονοπατιών (J. Shaikhali et al., 2008)

### 1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου- Τι είναι και πώς παράγονται

Ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προέρχονται από το οξυγόνο αποτελούν την πιο σημαντική τάξη τέτοιων μορφών που δημιουργούνται σε ζωντανά συστήματα και είναι γνωστές ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ). Οι κυριότερες ΔΜΟ είναι η ρίζα του ανιόντος σουπεροξειδίου  $O_2^-$ , που ακολουθείται από μείωση ενός ηλεκτρονίου με ταυτόχρονη πρόσληψη δύο πρωτονίων για απόδοση υπεροξειδίου του υδρογόνου  $H_2O_2$ , το οποίο δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, αλλά είναι χημικά πιο δραστικό από το μοριακό οξυγόνο και για αυτό περιλαμβάνεται στην ομάδα των ΔΜΟ. Λαμβάνοντας ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, το  $H_2O_2$  διασπάται σε ρίζα υδροξυλίου ( $HO^*$ ), καθώς και ανιόν

υδροξυλίου. Οι ΔΜΟ, βέβαια δεν περιλαμβάνουν μόνο τα προαναφερθέντα είδη, αλλά και διάφορα επιπλέον υπεροξειδία, όπως λιπιδικά και πρωτεϊνικά υπεροξειδία, καθώς και υπεροξειδία νουκλεϊκών οξέων (Volodymyr I. Luschak et al., 2014; H.M Semchyshyn et al., 2012).

Οι ΔΜΟ είναι γνωστές για το διπλό τους ρόλο στα βιολογικά συστήματα, καθώς μπορεί να αποβούν για αυτά είτε βλαβερές είτε ωφέλιμες (M. Valko et al., 2005). Για παράδειγμα, ευεργετικές επιδράσεις των ΔΜΟ περιλαμβάνουν την άμυνα έναντι σε μολυσματικούς παράγοντες, καθώς και τη λειτουργία πολλών συστημάτων επικοινωνίας των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι οι ΔΜΟ επεμβαίνουν στην έκφραση ενός αριθμού γονιδίων και μονοπατιών μεταγωγής σήματος (V.J. Thannickal et al., 2000). Λόγω της οξειδωτικής τους φύσης οι ΔΜΟ επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση και μπορούν, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, να προκαλέσουν θετική ή αρνητική απόκριση από τα κύτταρα. Οι ΔΜΟ, επομένως, να παίζουν καθοριστικό ρόλο ως «δευτερογενείς αγγελιοφόροι» (C.J. Lowenstein et al., 1994). Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι ΔΜΟ μπορεί να αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές βλάβης σε κυτταρικές δομές συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, μεμβρανών, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, ακόμη και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή νέκρωση.



Εικόνα 2: ΔΜΟ- επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια ( M. Valko et al, 2005)

Οι ΔΜΟ μπορούν να παραχθούν τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς ουσίες. Πιθανές ενδογενείς πηγές αποτελούν τα μιτοχόνδρια, ο μεταβολισμός του

κυτοχρώματος P450, περοξισώματα, καθώς και η κυτταρική ενεργοποίηση οδηγούμενη από φλεγμονή.

Αναλυτικότερα, στα ευκαρυωτικά κύτταρα πάνω από το 90% των ΔΜΟ παράγονται από τα μιτοχόνδρια. Πιθανότατα οι περισσότερες ΔΜΟ δημιουργούνται μέσω της «απόδρασης» ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα κυρίως από το συνένζυμο Q στο μοριακό οξυγόνο. Τα ηλεκτρόνια που «δραπετεύουν» αλληλεπιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και δίνουν  $O_2^-$ . Έπειτα, μετατρέπεται αυθόρμητα ή ενζυματικά σε  $H_2O_2$  και  $HO\cdot$ . Το ποσό των ηλεκτρονίων που «δραπετεύουν» από την αναπνευστική αλυσίδα ποικίλει και εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών.

Ένα μικρό ποσοστό των ΔΜΟ παράγονται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, πλασματικές και πυρηνικές μεμβράνες καθώς και κάποιες οξειδάσες. Στο ΕΔ η παραγωγή τους συνδέεται κυρίως με τη λειτουργία του συστήματος υδροξυλίωσης που αντιπροσωπεύεται από την οικογένεια ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Κατά την οξείδωση των υποστρωμάτων, ένα ποσοστό των ηλεκτρονίων «δραπετεύει» από την αλυσίδα μεταφοράς και, ομοίως με τα μιτοχόνδρια, συνδέεται στο  $O_2$  δίνοντας  $O_2^-$  και προϊόντα του μετασχηματισμού του. Τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση υδροξυλίωσης μπορεί, επίσης, να γίνουν τα ίδια επαγωγείς ΔΜΟ καθώς μπορεί να εισέλθουν σε αυτοοξειδωτικούς κύκλους (Volodymyr I. Lushchak et al., 2014).

Διάφορες οξειδάσες είναι, επίσης, ισχυροί παραγωγοί ΔΜΟ. Οξειδώνουν υδατάνθρακες, αλδεΐδες, αμινοξέα, ετεροκυκλικές ενώσεις και άλλα. Ο φυσιολογικός ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης στη συνολική ισορροπία των ΔΜΟ, τουλάχιστον στα ζώα, έχει κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον. Πιστεύεται ότι υπό συνθήκες υποξίας το ένζυμο αυτό αποτελεί ίσως τη βασική πηγή παραγωγής ΔΜΟ (C.E. Griguer et al., 2006, J. Nanduri et al., 2013). Ανήκει σε μια ομάδα ενζύμων που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο άτομο μολυβδαινίου και κάθε πρωτεϊνική υπομονάδα περιέχει δυο διμερή σιδήρου-θείου καθώς και ένα μόριο FAD. Η οξειδάση της ξανθίνης, η οποία θα αναφερθεί και παρακάτω, καταλύει την αντίδραση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Και στα δύο βήματα, το μοριακό οξυγόνο μειώνεται, σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου στο πρώτο στάδιο και υπεροξειδίου του υδρογόνου στο δεύτερο (M. Valko et al., 2005).

Επιπλέον ενδογενείς πηγές ΔΜΟ είναι τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα. Ενεργοποιημένα μακροφάγα επάγουν μια αύξηση στην πρόσληψη οξυγόνου και αυτό οδηγεί στη δημιουργία ποικιλίας ΔΜΟ, συμπεριλαμβανομένων του

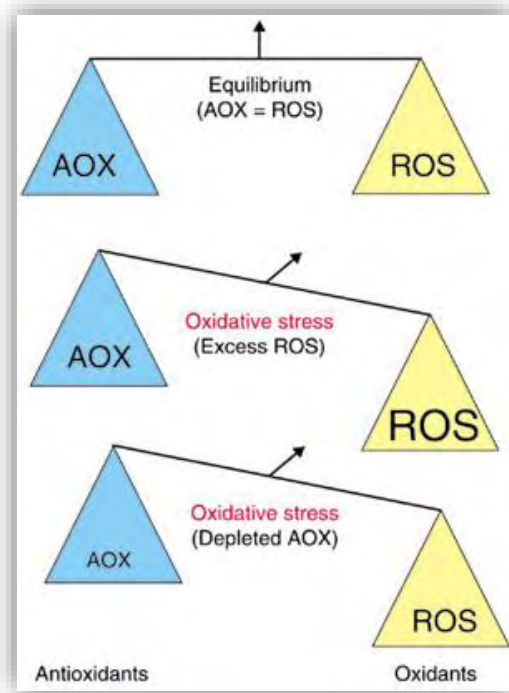
ιόντος σουπεροξειδίου, νιτρικού οξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου(E.M. Conner et al., 1996).

Μια σειρά από εξωγενείς διαδικασίες μπορεί, επίσης, να οδηγήσουν στην παραγωγή ΔΜΟ. Περιβαλλοντικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων μη-γονοτοξικών καρκινογόνων μπορούν να επάγουν άμεσα ή έμμεσα την παραγωγή ΔΜΟ στα κύτταρα. Η επαγωγή των ΔΜΟ έχει παρατηρηθεί μετά την έκθεση σε ποικίλα ξενοβιοτικά. Αυτά περιλαμβάνουν χλωριωμένες ενώσεις, μεταλλικά ιόντα, ακτινοβολία και βαρβιτουρικά( J.E. Klaunig et al., 1997).

## **1.2. Οξειδωτικό στρες**

Η συσσωρευμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στα κύτταρα, είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές, οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικού στρες(François Gagné, 2014) .

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ριζών και της αποικοδόμησής τους από αντιοξειδωτικά συστήματα. Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας (Manuel T. Velasquez, 2015). Οι οξειδωτικά-μεσολαβούμενες αντιδράσεις εμπλέκονται σε πολλές θεμελιώδεις διεργασίες των ζωντανών οργανισμών, όπως η κυτταρική αναπνοή, η σύνθεση λιπιδίων, η ανοσία (φαγοκυττάρωση), καθώς και ο μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών. Όταν, λοιπόν, η συγκέντρωση των ΔΜΟ συσσωρεύεται ανεξέλεγκτα προκύπτει οξειδωτική βλάβη πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα, γονοτοξικότητα, ακόμη και καρκινογένεση όταν τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη πολλαπλασιάζονται (François Gagné, 2014).



Εικόνα 3: Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων των ΔΜΟ και των αντιοξειδωτικών αντανάκλαται από το οξειδωτικό στρες.

### 1.3. Αντιοξειδωτική Άμυνα

Οι επιπτώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου εξισορροπούνται με την αντιοξειδωτική δράση μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών ουσιών, καθώς και αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν πολυεπίπεδο και περίπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα, το οποίο λειτουργεί είτε εξουδετερώνοντας τις ΔΜΟ, είτε ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές επιδράσεις τους. Αυτή η αντιοξειδωτική άμυνα είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιτελεί την άμεση απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών( προ- οξειδωτικών), παρέχοντας έτσι μέγιστη προστασία σε κύτταρα, ιστούς και όργανα.

Η έννοια του βιολογικού αντιοξειδωτικού αναφέρεται σε κάθε ένωση, η οποία, όταν υπάρχει σε χαμηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με αυτή ενός οξειδωσιμου υποστρώματος, είναι ικανή είτε να καθυστερήσει είτε να αποτρέψει την οξείδωσή του (B. Halliwell et al., 1999). Στις αντιοξειδωτικές λειτουργίες συνεπάγονται η μείωση του οξειδωτικού στρες, των μεταλλάξεων του DNA, των κακοηθών μετασχηματισμών, καθώς και άλλων παραμέτρων κυτταρικής βλάβης. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει πως η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν τις συνέπειες της δράσης των ΔΜΟ, και να ελαττώνουν την εμφάνιση καρκίνου και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Ωστόσο, κυρίως σε περίπτωση διαρκούς δράσης των ΔΜΟ, η ικανότητα

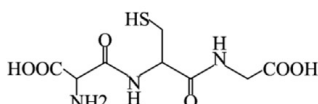
του αμυντικού συστήματος απέναντι σε αυτές μπορεί να υπερνικάται, οδηγώντας στην εμφάνιση κάποιας ασθένειας (A. Godic et al., 2014). Μια αποτελεσματική αντιοξειδωτική ουσία θα πρέπει ανάμεσα σε άλλα να: α) να απομακρύνει εξειδικευμένα τις ελεύθερες ρίζες, β) να έχει θετική επίδραση στην έκφραση γονιδίων, γ) να απορροφάται εύκολα, δ) η συγκέντρωσή της σε ιστούς και βιολογικά υγρά να βρίσκεται σε φυσιολογικά σχετικά επίπεδα (M. Valko et al., 2005).

Οι πρώτοι τύποι αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων ενάντια στην οξειδωτική βλάβη που ταυτοποιήθηκαν, είναι αυτών που αποτρέπουν την εμφάνιση των ΔΜΟ και αυτών που μπλοκάρουν, δεσμεύουν τις ρίζες που έχουν σχηματιστεί. Αυτά τα συστήματα, τα οποία συναντώνται σε υδατικά και μεμβρανικά κυτταρικά τμήματα, μπορεί να είναι ενζυματικά και μη ενζυματικά. Ένα ακόμη σημαντικό αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου αντιπροσωπεύεται από διαδικασίες επιδιόρθωσης, που απομακρύνουν τα βιομόρια που έχουν υποστεί βλάβη, πριν η επιθετικότητά τους καταστήσει δυνατές τις μεταβολές στο μεταβολισμό του κυττάρου (K. H. Cheeseman et al., 1993). Η παρέμβαση των συστημάτων επιδιόρθωσης συνίσταται στην επιδιόρθωση νουκλεϊκών οξέων με οξειδωτική βλάβη από ειδικά ένζυμα (B. Poljsak et al., 2012), την απομάκρυνση οξειδωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεολυτικό σύστημα, καθώς και την επιδιόρθωση οξειδωμένων λιπιδίων από φωσφολιπάσες, υπεροξειδάσες ή ακυλο- τρανσφεράσες (C.A. Hitchon et al., 2004).

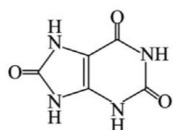
Ενώσεις όπως οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλη), τα καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, όπως το βενζοϊκό, φλαβονοειδή, ανθοκυανοειδή) θεωρούνται τα βασικότερα εξωγενή αντιοξειδωτικά. Αυτά λαμβάνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφής ή συμπληρωμάτων. Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει πως μια διατροφή πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, σιτηρά, όσπρια και ω-3 λιπαρά οξέα θα μπορούσε να δράσει ως προληπτικός παράγοντας όσον αφορά την εμφάνιση ασθενειών.

Έχει επιβεβαιωθεί ότι εξωγενή αντιοξειδωτικά, τα οποία υπάρχουν στα φρούτα και τα λαχανικά, αντισταθμίζουν πάντα τη δραστηριότητα της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας (W.C. Willett et al., 2006). Η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου διατηρείται από το περίπλοκο ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνάς του, το οποίο περιλαμβάνει ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καθώς και μη ενζυμικές ενώσεις, όπως η θειολικά, πρωτεΐνες (φεριτίνη, τρανσφερίνη, αλβουμίνη)

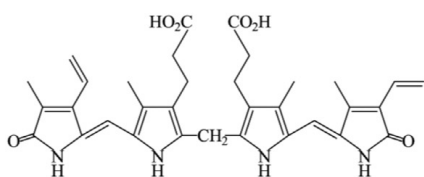
#### Endogenous antioxidants



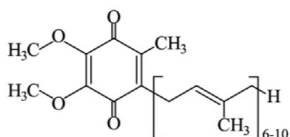
Glutathione



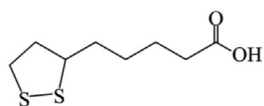
Uric Acid



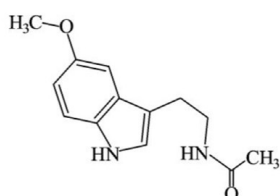
Bilirubin



Coenzyme Q

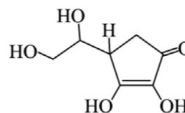


Alpha Lipoic Acid

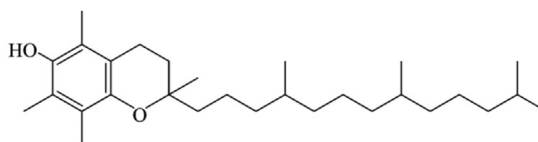


Melatonin

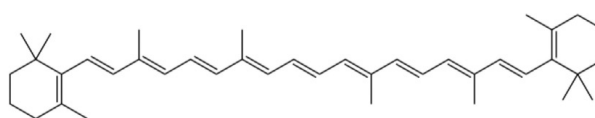
#### Exogenous antioxidants



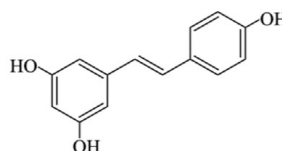
Vitamin C



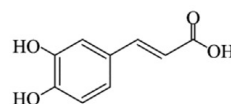
Vitamin E



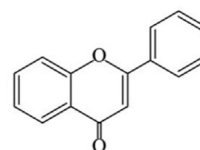
β Carotene



Resveratrol



Caffeic Acid

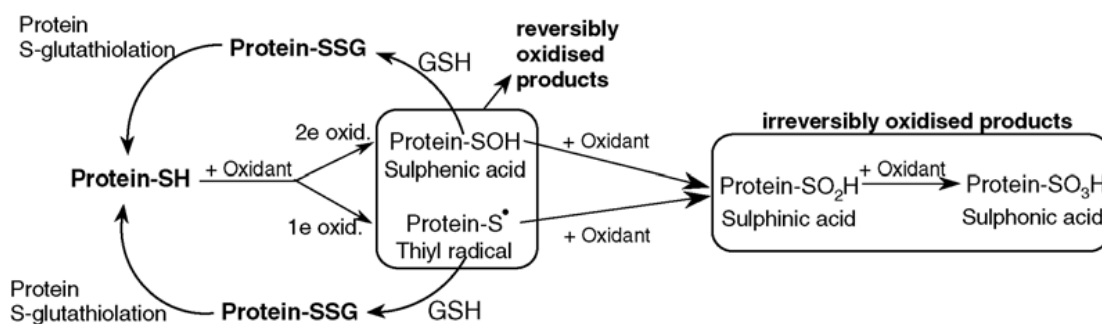


The Flavone Typical Structure

και χαμηλού μοριακού βάρους “scavengers”, όπως το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q και το λιποϊκό οξύ (B. Poljsak et al., 2012).

Το κυριότερο θειολικό αντιοξειδωτικό είναι το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί ένα πολυλειτουργικό ενδοκυτταρικό μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό. Θεωρείται πως είναι το πιο σημαντικό θειολικό- δισουλφιδικό ρυθμιστικό του κυττάρου. Είναι ιδιαίτερα άφθονη στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το πιο διαλυτό αντιοξειδωτικό σε αυτά τα κυτταρικά διαμερίσματα. Η ανηγμένη μορφή είναι η GSH, γλουταθειόνη, και η οξειδωμένη μορφή είναι η GSSG, δισουλφιδική γλουταθειόνη (R. Masella et al., 2005).

Η GSH στον πυρήνα διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση κρίσιμων πρωτεϊνών που περιέχουν υδροθειομάδα( πρωτεΐνη- SH)οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA. Ένα οξειδωτικό περιβάλλον οδηγεί σε γρήγορη τορποποίηση τέτοιων πρωτεϊνών: οξείδωση 2 ηλεκτρονίων αποδίδει σουλφενικά οξέα( πρωτεΐνη- SOH) και οξείδωση 1 ηλεκτρονίου αποδίδει θειολικές ρίζες (πρωτεΐνη- S<sup>•</sup>) (Y. B Ji et al., 1999). Αυτά τα μερικώς οξειδωμένα προϊόντα αντιδρούν με τη GSH και σχηματίζουν S- γλουταθειομένη πρωτεΐνη( πρωτεΐνη- SSG), που ανάγεται περαιτέρω από τον κύκλο της γλουταθειόνης μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, καθώς και μικρών πρωτεϊνών, όπως η γλουταρεδοξίνη και η θειορεδοξίνη, ώστε να αποκατασταθούν οι σουλφιδρυλικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνη- SH).



Εικόνα 5: Ρόλος της GSH στην οξείδωση των σουλφιδρυλικών πρωτεϊνών (M. Valko et al, 2005)

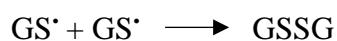
Ωστόσο, σε περίπτωση που η διαδικασία της οξείδωσης αυτών των πρωτεϊνών δεν «παγιδεύεται» από την GSH, επιπλέον οξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό μη αναστρέψιμων οξειδωμένων μορφών, όπως σουλφονικών οξέων (πρωτεΐνη- SO<sub>3</sub>H).

Γενικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα των θειολικών ενώσεων οφείλεται στο άτομο θείου, το οποίο μπορεί εύκολα να «φιλοξενήσουν» την απώλεια ενός μονήρους ηλεκτρονίου (H. Karoui et al., 1996). Η αντίδραση της γλουταθειόνης με τη ρίζα R<sup>•</sup> μπορεί να περιγραφεί ως:





Οι θειολικές ρίζες που αναγεννούνται μπορεί να διμεριστούν για να σχηματίσουν το μη ριζικό προϊόν, οξειδωμένη γλουταθειόνη( GSSG):



Η GSSG είναι συσσωρευμένη μέσα στα κύτταρα και ο λόγος GSH/ GSSG είναι μία καλή μέτρηση του οξειδωτικού στρες ενός οργανισμού (C. Hwang et al., 1992).

Οι κύριοι προστατευτικοί ρόλοι της γλουταθειόνης ενάντια στο οξειδωτικό στρες είναι: α) αποτελεί συμπράγοντα πολλών αποτοξινωτικών ενζύμων απέναντι στο οξειδωτικό στρες, για παράδειγμα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), μεταφορά της γλουταθειόνης και άλλα, β) η GSH συμμετέχει στη μεταφορά των αμινοξέων μέσω της πλασματικής μεμβράνης, γ) απομακρύνει τη ρίζα υδροξυλίου και το διατομικό μόριο οξυγόνου άμεσα, αποτοξινώνοντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου και υπεροξειδία λιπιδίων μέσω της καταλυτικής δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, τέλος δ) η γλουταθειόνη είναι ικανή να αναγεννήσει τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά, τις βιταμίνες C και E, στη δραστική τους μορφή ( D. P. Jones et al., 2000).

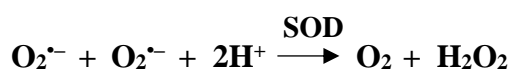
## 1.4. Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Έχει διατυπωθεί πως, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών είναι σε μέτριο βαθμό υπέρ των πρώτων, προκαλώντας, έτσι, κάποιο οξειδωτικό στρες. Αυτό απαιτεί την παρέμβαση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού (W. Dröge, 2002).

Τα πιο αποτελεσματικά ενζυματικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (J. M. Mates et al., 1999).

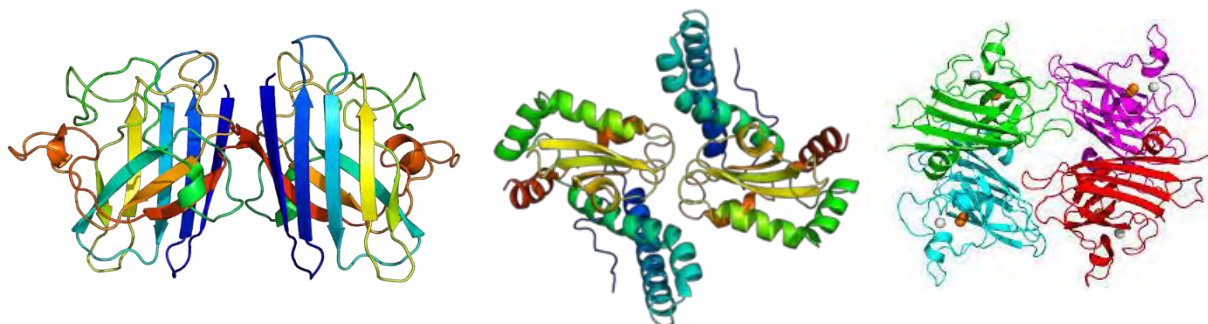
### 1.4.1. Υπεροξειδική Δισμουτάση SOD

Ένα από τα πιο σημαντικά, λοιπόν, ενδοκυτταρικά ενζυματικά αντιοξειδωτικά είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) (EV 1.15.1.1). Η περιγραφή της SOD ήταν η πρώτη «επαναστατική» ανακάλυψη σε αυτό τον κλάδο (J. M. McCord et al., 1969). Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση:



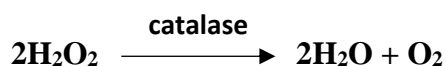
Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου υπάρχει σε πολλές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, καθώς και στον αριθμό των υπομονάδων, συμπαραγόντων και άλλων χαρακτηριστικών. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις μορφές της SOD: η κυτταροπλασματική CU, ZN- SOD, η μιτοχονδριακή Mn-SOD και η εξωκυτταρική SOD (EC- SOD) (G. N. Landis et al., 2005). Η SOD

καταστρέφει τη  $O_2^{\cdot -}$  με αξιοσημείωτα υψηλό ρυθμό αντίδρασης, μέσω επιτυχούς οξείδωσης και αναγωγής του μεταλλικού ιόντος μετάπτωσης στο ενεργό κέντρο, με ένα μηχανισμό τύπου “Ping- Pong” (J. M. Mates et al., 1999).



Εικόνα 6: Οι δομές των Cu, Zn- SOD, Mn- SOD και EC- SOD από αριστερά προς δεξιά, αντίστοιχα.

- Η **καταλάση** (EC 1.11.1.6) είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα κύτταρα των φυτών, των ζώων και των αερόβιων βακτηρίων. Εντοπίζεται στα κυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται περοξισώματα. Πολύ αποτελεσματικά καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο:

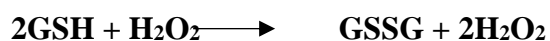


#### 1.4.2. S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η μία είναι η σεληνιο- ανεξάρτητη (S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης, **GST**, EC 2.5.1.18), ενώ η άλλη είναι η σεληνιο- εξαρτώμενη (GPx, EC 1.11.1.19). Αυτά τα δύο ένζυμα διαφέρουν στον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού του σεληνίου με το ενεργό κέντρο και στον μηχανισμό κατάλυσης. Ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης αποτελεί έναν από τους πιο απαραίτητους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας.

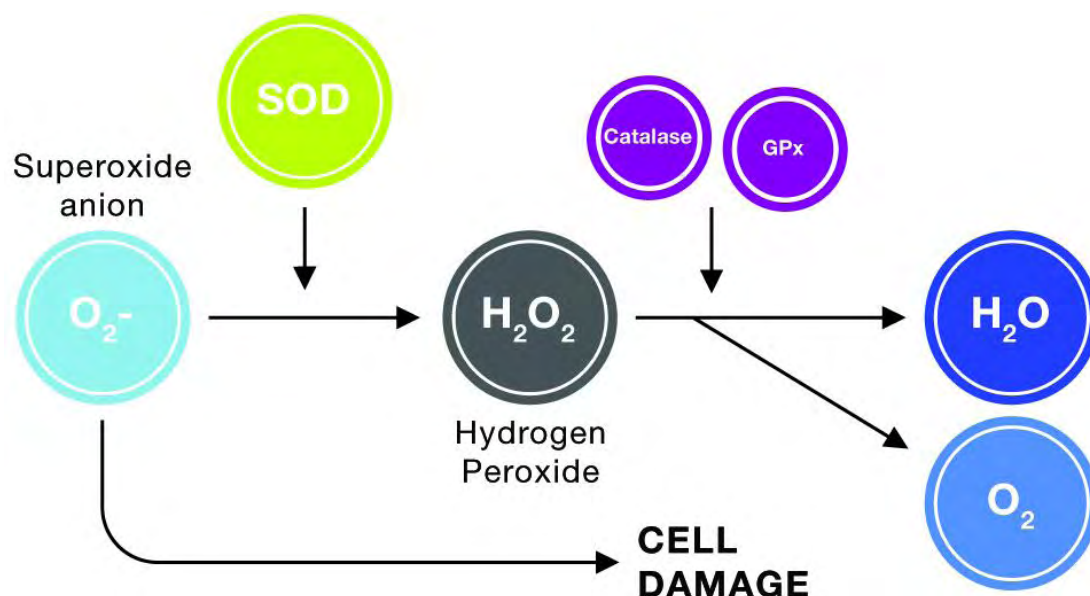
Η GST είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού που δρα στη φάση II και καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του.

- Ο άνθρωπος έχει τέσσερις διαφορετικές Se- εξαρτώμενες υπεροξειδάσες γλουταθειόνης (**GPx**). Όλα τα GPx ένζυμα είναι γνωστά για την προσθήκη δύο ηλεκτρονίων με σκοπό την αναγωγή υπεροξειδίων μέσω του σχηματισμού σεληνολών (Se- OH). Η GPx δρα σε σύζευξη με την GSH, η οποία βρίσκεται στα κύτταρα σε υψηλές (μM) συγκεντρώσεις. Το υπόστρωμα της αντίδρασης που καταλύει η GPx είναι το  $H_2O_2$ , ή ένα οργανικό υπεροξείδιο ROOH. Διασπά τα υπεροξείδια σε νερό (ή αλκοόλη), ενώ οξειδώνει αυθόρμητα την GSH:





Η GPx συναγωνίζεται την καταλάση για το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ως υπόστρωμα και είναι η κυριότερη πηγή προστασίας ενάντια σε χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες (M. Valko et al., 2006).



#### 1.4.3. Σύνθεσή της γ- γλουταμυλοκυστεΐνης ή λιγάση γλουταμική κυστεΐνης ( γ-GCL)

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η GSH είναι μια ενδογενώς συντιθέμενη τριπεπτιδική θειόλη με σημαντικές βιοχημικές και αντιοξειδωτικές ικανότητες. Αποτελεί μέρος ενός αριθμού βασικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως η πρωτεϊνική σύνθεση, η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, καθώς και η οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Meister, 1983; Wu et al., 2004; Townsend, 2007).

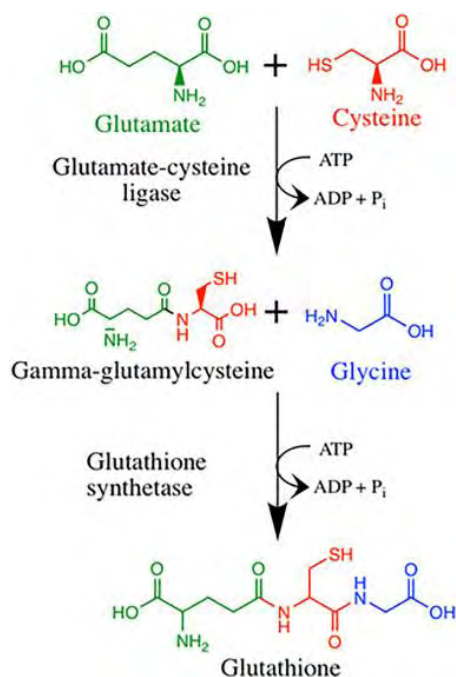
Η κυτταρική ομοιόσταση της GSH ρυθμίζεται από το ρυθμό σύνθεσης, χρήσης, και αποβολής της από το κύτταρο. Η ικανότητα βιοσύνθεσης GSH ποικίλων κυττάρων και ιστών στο σώμα ελέγχεται, επίσης, από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της διαθεσιμότητας του υποστρώματος( κυρίως κυστεΐνης) και της δραστηριότητας της λιγάσης γλουταμικής κυστεΐνης ( GCL), το ρυθμοκαθοριστικό ένζυμο στη σύνθεση της GSH (Griffith, 1999; Griffith and Mulcahy, 1999).

Επειδή η GCL αποτελεί κύριο καθοριστή των κυτταρικών επιπέδων της GSH, πολλά εργαστήρια έχουν μελετήσει παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστηριότητά της. Στους περισσότερους κατώτερους οργανισμούς το ένζυμο GCL είναι ένα μονό πολυπεπτίδιο, αλλά τα περισσότερα ευκαρυωτικά ένζυμα είναι ετεροδιμερή σύμπλοκα, αποτελούμενα από δύο διακριτά γονιδιακά προϊόντα. Η καταλυτική υπομονάδα (GCLC) είναι η μεγαλύτερη από τις δύο υπομονάδες και

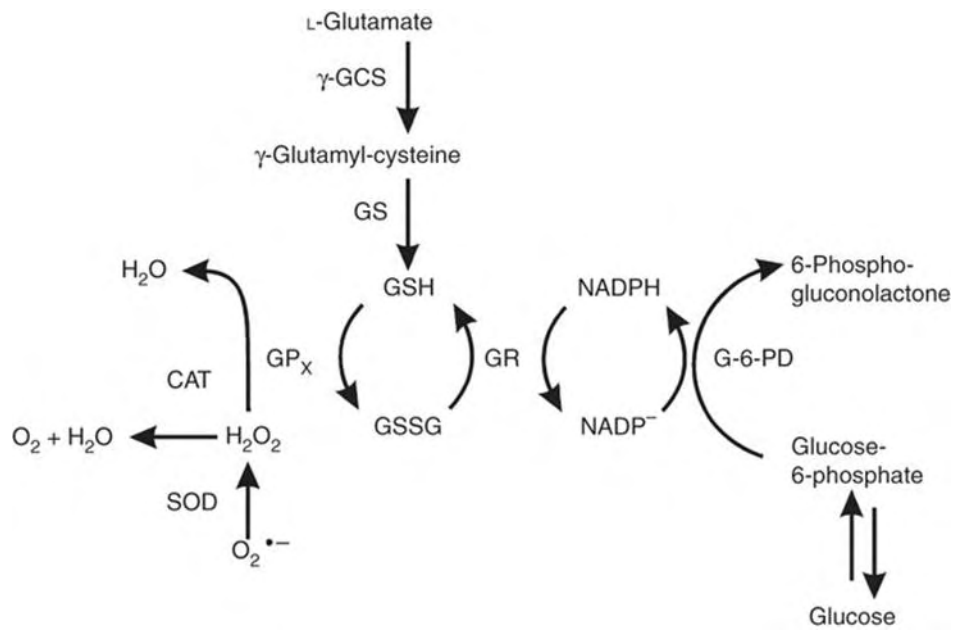
περιέχει το ενεργό κέντρο που είναι υπεύθυνο για τον ATP- εξαρτώμενο σχηματισμό δεσμού μεταξύ κυστεΐνης και γ- καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμινικού. Η ρυθμιστική υπομονάδα (GCLM) είναι μικρότερη και μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τη GCLC δρα για την αύξηση της καταλυτικής ικανότητας της GCLC (Meister, 1983; Griffith, 1999; Yang et al., 2007).

Υπάρχουν κάποιες ενδιαφέρουσες διαφορές στη σύσταση και τη λειτουργία της GCL μεταξύ μη θηλαστικών οργανισμών. Για παράδειγμα, ενώ δεν υπάρχει αντίστοιχη GCLM στα φυτά, η GCL μπορεί ακόμα να διμεριστεί με έναν οξειδοαναγωγικά-εξαρτώμενο τρόπο, που επηρεάζει δραματικά την ενζυμική της δραστηριότητα (Hicks et al., 2007).

Τα σχετικά επίπεδα των υπομονάδων της GCL είναι ένας κύριος καθοριστής της κυτταρικής δραστηριότητας της GCL και ρυθμίζονται σημαντικά σε μεταγραφικό και μετα- μεταγραφικό επίπεδο σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Griffith, 1999; Griffith and Mulcahy, 1999; Rahman and MacNee, 2000; Wild and Mulcahy, 2000). Η δραστηριότητα της GCL μπορεί επίσης να ρυθμιστεί ταχέως από μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις από προ υπάρχουσα GCLC ή/και GCLM πρωτεΐνη. Έχει φανεί, λοιπόν, πώς εκτός από τη μεταγραφική ρύθμιση των υπομονάδων της GCL, το οξειδωτικό στρες ενισχύει την κυτταρική της δραστηριότητα μέσω μετα- μεταφραστικής τροποποίησης της μίας ή και των δύο υπομονάδων.



Εικόνα 7: Βιοσυνθετικό μονοπάτι της γλουταθειόνης.



Εικόνα 8: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT

## 2. Πολυφαινόλες

Οι φυσικές πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών, και κεντρίζουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον ως πιθανοί παράγοντες για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Τα φυτά παράγουν χιλιάδες φαινολικές ενώσεις ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Είναι πολύ σημαντικές για τη φυσιολογία των φυτών καθώς εμπλέκονται σε ποικίλες λειτουργίες, όπως η δομή, ο φυσικός χρωματισμός, η γονιμοποίηση, η αντίσταση σε παθογόνα και εχθρούς, η βλάστηση και η ανάπτυξη (Dewick, 1997). Οι πολυφαινόλες έχουν πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, όπως στην παραγωγή χρωμάτων, χαρτιών, καλλυντικών, καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα (φυσικές χρωστικές ουσίες και συντηρητικά) (L. Bravo, 1998).

Πολυφαινολικές ενώσεις απαντώνται σε όλα, σχεδόν, τα φυτά, ωστόσο η διανομή τους σε επίπεδο ιστών και κυττάρων δεν είναι ομοιόμορφη. Για παράδειγμα, οι εξωτερικές στοιβάδες των φυτών περιλαμβάνουν υψηλότερα επίπεδα πολυφαινολών σε σχέση με τις εσωτερικές στοιβάδες, ή αδιάλυτες πολυφαινολικές ενώσεις σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα, ενώ οι διαλυτές εντοπίζονται στα κενοτόπια (M. Wink, 1997).

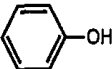
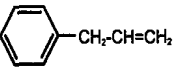

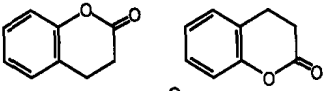
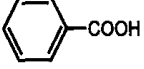
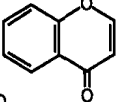
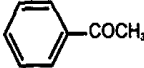
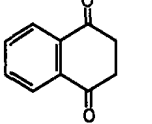
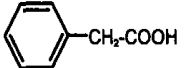
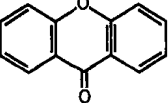
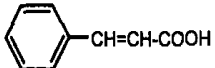
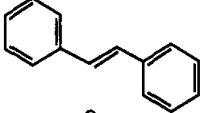
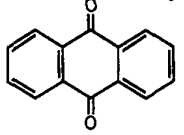
Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις και οι αναλογίες των πολυφαινολικών ενώσεων στα φυτά εξαρτώνται σημαντικά από την ωρίμανση την περίοδο της συγκομιδής, εδαφικούς παράγοντες, όπως ο τύπος του εδάφους, η έκθεση στον ήλιο, η θερμοκρασία, η βροχή, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Manach et al., 2004).

Επομένως, μπορεί, γενικά, να υποστηριχθεί πως το ποσοστό των πολυφαινολικών ενώσεων στα φυτά μειώνεται με την αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης και υπό υψηλές θερμοκρασίες τόσο κατά την αποθήκευση όσο και κατά την επεξεργασία, λόγω της αυξημένης ευαισθησίας των πολυφαινολών στην οξείδωση. Αυτοί οι παράγοντες, λοιπόν, δείχνουν πως οι συγκεντρώσεις και τα ποσοστά των πολυφαινολών ποικίλουν ιδιαίτερα στα φυτά και στα φυτικά προϊόντα (π.χ. εκχυλίσματα), από τα οποία παρασκευάζονται (Tangney and Rasmussen, 2013).

## 2.1. Βιοσύνθεση- Τάξεις

Οι πολυφαινόλες προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: του σικιμικού και του μηλονικού οξέος. Πρόκειται για μία εξαιρετικά ευρέα και περίπλοκη ομάδα φυτικών ουσιών. Η πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων έχουν ως πρόδρομο μόριο το 4- υδροξυλ- κινναμικό οξύ( *p*- κουμαρικό οξύ), το οποίο προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη (Chesson et al., 1997).

Οι φυσικές πολυφαινόλες μπορεί να εκτείνονται από απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, μέχρι υψηλά πολυμερισμένα στοιχεία, όπως οι ταννίνες. Πρόκειται για οργανικές ενώσεις, των οποίων το μόριο περιλαμβάνει έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο ( $C_6$ ). Απαντώνται κυρίως σε συζευγμένη μορφή, με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα σακχάρων συνδεδεμένα με υδροξυλικές ομάδες. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης ενώσεις, στις οποίες η μονάδα σακχάρου συνδέεται άμεσα με ένα άτομο C του αρωματικού δακτυλίου. Τα συνδεδεμένα σάκχαρα μπορεί να υπάρχουν ως μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτες. Η γλυκόζη αποτελεί το πιο κοινό σακχαρικό κατάλοιπο. Επιπλέον, συναντώνται και συνδέσεις με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια (L. Bravo, 1998).

Simple phenols	$C_6$		Phenylpropenes	$C_6-C_3$	
Benzoquinones	$C_6$		Coumarins, isocoumarins	$C_6-C_3$	
Phenolic acids	$C_6-C_1$		Chromones	$C_6-C_3$	
Acetophenones	$C_6-C_2$		Naftoquinones	$C_6-C_4$	
Phenylacetic acids	$C_6-C_2$		Xanthones	$C_6-C_1-C_6$	
Hydroxycinnamic acids	$C_6-C_3$		Stilbenes	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoids	$C_6-C_3-C_6$		Anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$	
Lignans, neolignans	$(C_6-C_3)_2$				
Lignins	$(C_6-C_3)_n$				

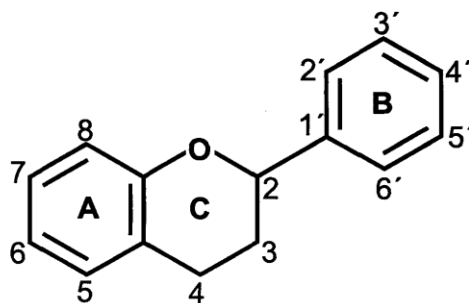
Εικόνα 9: Διαφορετικές κατηγορίες πολυφαινολών ανάλογα με τη βασική τους χημική δομή.



Η ποικιλία των φαινολικών ενώσεων αντανακλά τις διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα σε έναν οργανισμό. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι πολυφαινολικές ενώσεις εμφανίζουν μεγάλο εύρος, από ουσίες με ένα βενζολικό δακτύλιο σε μόρια με πολλούς, επομένως είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους σε τάξεις (Araújo et al., 2011).

Η πιο αποδεκτή ταξινόμηση των πολυφαινολών είναι αυτή που βασίζεται στη χημική τους δομή. Οι κύριες τάξεις τους είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, τις λιγνάνες και τις ταννίνες (Mocanu et al., 2015).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο κοινή και την πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα φυτικών φαινολών. Η κοινή τους δομή είναι αυτή των διφαινυλπροπανίων ( $C_6-C_3-C_6$ ) με τη γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα μεταξύ των φαινολικών ομάδων, που σχηματίζουν, συνήθως, ένα οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Στην εικόνα 6 φαίνεται η βασική δομή και το σύστημα αρίθμησης που χρησιμοποιείται για το φλαβονοειδή πυρήνα. Βιογενετικά, ο δακτύλιος A προέρχεται συνήθως από ένα μόριο ρεσορκινόλης ή φλορογλυκινόλης, συντίθεται στο μονοπάτι του μηλονικού, ενώ ο δακτύλιος B προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Ενίοτε, τα φλαβονοειδή συναντώνται στα φυτά ως αγλυκόνες, ωστόσο συνήθως απαντώνται ως παράγωγα γλυκοζιτών (Lewandowska et al., 2015; Ramos et al., 2007).



Εικόνα 10: Βασική δομή της ομάδας των φλαβονοειδών (L. Bravo, 1998).

Οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες εντοπίζονται, κυρίως, στα εξωτερικά τμήματα των φυτών, ενώ οι ρίζες και οι κόνδυλοι περιέχουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, με ελάχιστες εξαιρέσεις, όπως τα κρεμμύδια και η γλυκόριζα (Manach, C. et al., 2004). Η ποικιλία ανάμεσα στα φλαβονοειδή προκαλεί την ανάγκη για περαιτέρω ταξινόμηση σε υποομάδες. Οι πιο σημαντικές περιλαμβάνουν τις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόλες και ισοφλαβόνες (González- Vallinas, M. et al., 2013; Araújo, J.R. et al., 2011; Wu, J.C. et al., 2016).



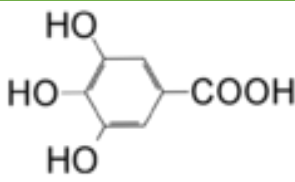
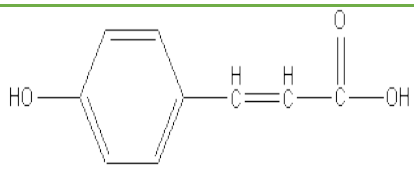
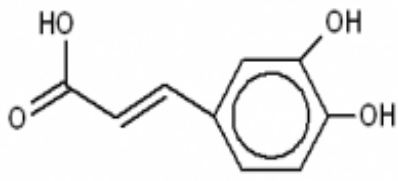
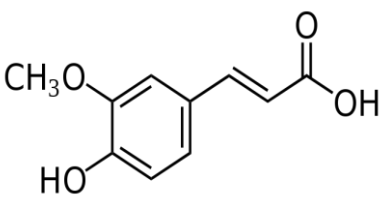
Ανάμεσα στα φλαβονοειδή, οι φλαβόνες( απογενίνη, λουτεολίνη, διοσμίνη), οι φλαβονόλες( κουερσετίνη, μυρισετίνη, καμφερόλη), και οι γλυκοζίτες τους είναι οι πιο κοινές ενώσεις. Είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, με εξαίρεση φύκη και μύκητες. Οι φλαβονόλες απαντώνται ως Ο- γλυκοζίτες, όμως φλαβόνες ως Ο-γλυκοζίτες και C- γλυκοζίτες είναι πολύ κοινές, με τις τελευταίες να χαρακτηρίζονται από το δεσμό άνθρακα- άνθρακα μεταξύ του ανωμερικού άνθρακα ενός μορίου σακχάρου και τους C-6 ή C-8 του φλαβονικού πυρήνα (Herrmann H., 1988).

Οι ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη, δαϊδζείνη) με το δακτύλιο Β του φλαβονικού μορίου συνδεδεμένο στον άνθρακα 3 του ετερόκυκλου, υπάρχουν, κυρίως στα όσπρια. Μεταξύ των πολυφαινολών, οι ισοφλαβόνες είναι οι καλύτερα απορροφούμενες από τον άνθρωπο. Η βιοδιαθεσιμότητά τους εξαρτάται, κυρίως, στη δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου. Επομένως, η απορρόφηση και οι θετικές επιδράσεις τους μπορεί να ποικίλουν αρκετά μεταξύ των ατόμων (Manach et al., 2005; Kris- Etherton, P.M., et al., 2002).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα φυτικών υδατοδιαλυτών χρωστικών ουσιών και είναι υπεύθυνες για το χρώμα των άνθεων και των καρπών ανώτερων φυτών. Παρέχουν τις κόκκινες, μωβ και μπλε αποχρώσεις ποικίλων φρούτων, λαχανικών, δημητριακών και άνθεων (Konczak, I., et al., 2004). Ο όρος ανθοκυανίνη αναφέρεται στους γλυκοζίτες της ανθοκυανιδίνης. Εκτός από τη γλυκοζυλίωση, απαντώνται, ακόμα, συνδέσεις με αρωματικά και αλειφατικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες και πολυμερικές χρωστικές σχηματισμένες από ανθοκυανιδίνες συμπυκνωμένες με άλλα φλαβονοειδή, είναι υπεύθυνες για το χρώμα του κόκκινου κρασιού (Mazza G. et al., 1995). Το χρώμα των ανθοκυανιδινών εξαρτάται από το pH. Χάρη στις πολλαπλές βιολογικές επιδράσεις τους, οι ανθοκυανίνες παίζουν πιθανότατα ένα ρόλο στην ενίσχυση της ποιότητας των τροφών (Dai, J., et al., 2010; Konczak, I., et al., 2004). Οι ανθοκυανίνες απορροφώνται ελάχιστα, ωστόσο πιθανόν δεν έχουν ταυτοποιηθεί όλοι οι μεταβολίτες, με αποτέλεσμα την υποτίμηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους (Manach, C. et al., 2005).

Μια, επίσης, πολύ σημαντική τάξη πολυφαινολών αποτελούν τα φαινολικά οξέα. Διαιρούνται σε δύο κύριες ομάδες: τα υδοξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκιναμικά οξέα με τα αντίστοιχα παράγωγά τους. Στα φαγητά, υπάρχουν ως εστέρες, είτε διαλυτοί είτε συσσωρευμένοι σε κενοτόπια, είτε αδιάλυτοι ως συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Yang, C.S., et al., 2001). Τα φαινολικά οξέα απαντώνται σε όσπρια, λαχανικά, κάποια ποτά, καθώς και το λάδι. Ένα από τα πιο κοινά φαινολικά οξέα είναι το καφεϊκό οξύ, που βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, συνήθως εστεροποιείται

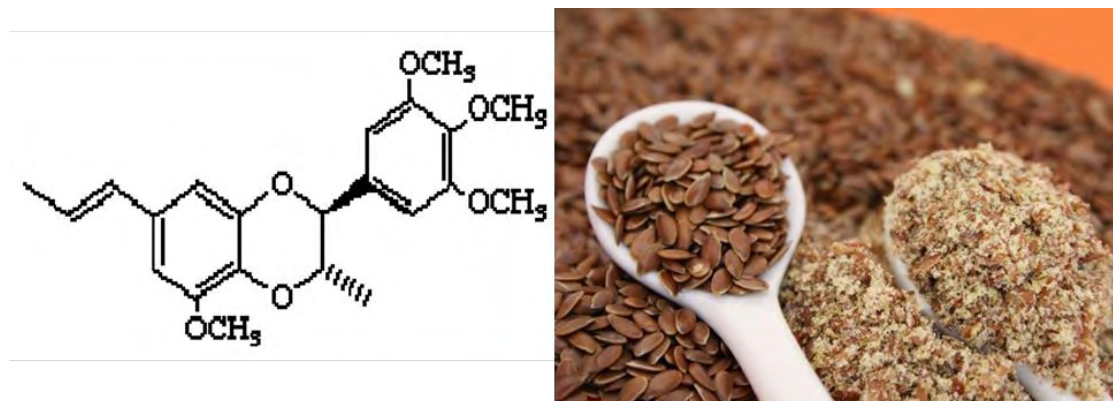
με κιννοϊκό οξύ σε χλωρογενικό οξύ, που αποτελεί την κύρια φαινολική ένωση στον καφέ (Scalber, A., et al., 2005).

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
<b>Γαλλικό Οξύ</b>	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
<b>Κουμαρικό Οξύ</b>	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) - 2 ακρυλικό		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	3 - (3,4-διυδροξυφαινυλ)-2-προπενοϊκό οξύ		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
<b>Φερουλικό οξύ</b>	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυκινναμικό οξύ		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>

Πίνακας 1: Ορισμένα από τα κύρια παράγωγα υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος που ανήκουν στα πολυφαινολικά οξέα

Η ανακάλυψη της τάξης των στυλβενίων των πολυφαινολών μπορεί να αποδοθεί, κυρίως, στο ονομαζόμενο « Γαλλικό παράδοξο», το οποίο αποκάλυψε τη σύνδεση μεταξύ της περιορισμένης κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και τη μειωμένη επικράτηση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων τύπων καρκίνου, ανεξαρτήτως της διατροφής. Η ρεσβερατρόλη, η περοστυλβένη και η πισειατανόλη αποτελούν τα πιο σημαντικά συστατικά της τάξης των στυλβενίων και ανήκουν στις φυτοαλεξίνες, καθώς συντίθενται στα φυτά σε απόκριση στη μόλυνση από μύκητες ή σε άλλο περιβαλλοντικού στρες (Jiang, Y.-L., et al., 2011; Seyed, M.A., et al., 2016; Siddiqui, I.A., et al., 2015). Παρόλο που το κρασί μπορεί να θεωρείται η κύρια βιοδιαθέσιμη διατροφική πηγή των στυλβενίων, σταφύλια, διάφορα μούρα, φυστίκια και διαθέσιμα συμπληρώματα διατροφής, αποτελούν σημαντικές πηγές επίσης. Παρά την αφθονία τους στα σταφύλια και το κρασί, η ρεσβερατρόλη και η περοστυλβένη είναι ελάχιστα βιοδιαθέσιμες, κυρίως λόγω στο γρήγορο μεταβολισμό και απέκκρισή τους (Bhat, K. P.L., et al., 2002; Stivala, L.A., et al., 2001).

Μια επιπλέον τάξη πολυφαινολών, όπως αναφέρθηκε, είναι οι λιγνάνες. Πρόκειται για διμερή, τα οποία περιέχουν δομή 2,3- διβενζυλ-βουτανίου, που σχηματίζεται από το διμερισμό αλκοολικών υπομονάδων, παραγώγων του κινναμικού οξέος. Οι λιγνάνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φυτοοιστρογόνα, καθώς υπάρχουν ως μικρά συστατικά σε πολλά φυτά, όπου εμπλέκονται στο σχηματισμό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Κύριες πηγές λιγνανών αποτελούν γεύματα με λιναρόσπορο και το αλεύρι (Kris- Etherton, P.M., et al., 2002; Lall, R.K., et al., 2015). Οι περισσότερες λιγνάνες φαίνεται πως διαπερνούν την εντερική οδό ως ίνες. Από την άλλη, ορισμένες, όπως η διατροφική ματαιρεσινόλη, μπορούν να μετατραπούν από τη μικροχλωρίδα του εντέρου σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη ( ταυτοποιημένες λιγνάνες στον άνθρωπο), που απορροφώνται μέσω του εντεροηπατικό κύκλο (Lall, R.K., et al., 2015; Owen, R.W., et al., 2000).



Εικόνα 11: Η χημική δομή λιγνανών (αριστερά) και ο λιναρόσπορος (δεξιά), η κύρια πηγή προέλευσής τους

Σε αντίθεση με τις τάξεις πολυφαινολών που περιγράφηκαν παραπάνω, οι ταννίνες είναι ενώσεις μεσαίου έως υψηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενες από ολιγο- και πολυμερή των ήδη αναφερθέντων πολυφαινολών. Έχοντας δύο ή τρεις φαινολικές υδροξυλικές ομάδες σε ένα φαινολικό δακτύλιο, οι ταννίνες είναι μόρια υψηλά υδροξυλιωμένα και, επομένως, μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες ( L. Bravo, 1998; Okuda, T., et al., 2011). Οι ταννίνες της φύσης διακρίνονται σε δυο βασικές ομάδες: υδρολυόμενες ταννίνες και συμπυκνωμένες. Οι υδρολυόμενες αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά -OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό (γαλλοταννίνες), το διγαλλικό (ή ταννικό) και το ελλαγικό (ελλαγιταννίνες). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες σχηματίζονται από αντιδράσεις πολυμερισμού της προκυανιδίνης. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν το σώμα του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου (Dai, J., et al., 2010; L. Bravo, 1998).

## 2.2. Πολυφαινόλες στο φαγητό

Οι πολυφαινόλες υπάρχουν σε όλα σχεδόν τις φυτικές τροφές( λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, φρούτα, καρύδια κ.ά.) και τα ποτά( κρασί, μηλίτη, μύρα, κακάο κ.ά.). Τα επίπεδά τους ποικίλουν σημαντικά, ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους (Herrmann H., 1998). Η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτικά φαγητά επηρεάζεται πολύ από γενετικούς παράγοντες, καθώς και περιβαλλοντικές συνθήκες. Άλλοι παράγοντες, όπως η βλάστηση, η ωρίμανση, το είδος, η επεξεργασία και η αποθήκευση, επηρεάζουν, επίσης, το περιεχόμενο των φυτικών πολυφαινολών. Για παράδειγμα το τσάι περιλαμβάνει ένα αριθμό πολυφαινολών διαφορετικών ποσοτήτων, ειδικά κατεχίνη και παράγωγά της. Οι τύποι και το ποσοστό των κατεχινών στα φύλλα τσαγιού ποικίλουν ανάλογα με την εποχή, την ηλικία του φύλλου, καθώς και το κλίμα (Kühnau J., 1976; Mazza G., 1995; Porter H., et al., 1991; Peleg H., et al., 1991).

Οι πολυφαινόλες είναι εν μέρει υπεύθυνες για τις αισθητήριες και διατροφικές ποιότητες των φυτικών τροφών. Η στυπτικότητα και η πικρή γεύση των φαγητών και των ποτών εξαρτάται από το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις. Η οξειδωση των πολυφαινολών κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση, θα έχει ως αποτέλεσμα είτε θετικές είτε ανεπιθύμητες επιδράσεις στις τροφές. Για παράδειγμα, οξειδωτικές μεταβολές, όπως το καφέ χρώμα του κακάο, κατά την επεξεργασία ή ο οξειδωτικός πολυμερισμός των πολυφαινολών του τσαγιού κατά την παρασκευή του μαύρου τσαγιού, οδηγούν στην ανάπτυξη διακριτών και επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Αντίθετα, το καφέ χρώμα που προκαλείται από ενζυματική αντίδραση πολυφαινολικών ενώσεων και μη ενζυματικές αντιδράσεις που δίνουν το καφέ χρώμα είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό μη επιθυμητού χρώματος και γεύσης σε φρούτα και λαχανικά (Ho C-T, et al., 1992; Shahidi F., et al., 1995).

Το περιεχόμενο των φυτικών τροφών σε πολυφαινόλες μπορεί να ποικίλει σε πολλές τάξεις μεγέθους. Στα όσπρια και τα δημητριακά, οι κύριες πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι ταννίνες. Τα όσπρια περιέχουν, επίσης, ισοφλαβόνες, ενώ τα λαχανικά αποτελούνται, κυρίως, από φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Αυτοί εντοπίζονται, κυρίως, στα εξωτερικά τμήματα του φυτού (οι ρίζες έχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, με εξαίρεση συγκεκριμένα φυτά, όπως τα κρεμμύδια και η γλυκόρριζα (Hertog MGL, et al., 1992). Τα μύρα χαρακτηρίζονται από το υψηλό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες, ενώ φρούτα, όπως τα μήλα και τα εσπεριδοειδή, είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, αντίστοιχα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι φλαβονόλη, και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο δέρμα (Shahidi F., et al., 1995; Hertog MGL, et al., 1992).



Εικόνα 12: Τροφές που περιέχουν πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο κρασί περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες και άλλα φλαβονοειδή. Το φαινολικό περιεχόμενο ποικίλει σημαντικά ανάμεσα ανάλογα με το αν είναι λευκά ή κόκκινα, καινούρια ή παλιά (Mazza G., 1995; Bakker J., et al., 1986).

### 2.3. Αντιοξειδωτική Δράση

Ανάμεσα στις αξιοσημείωτες βιολογικές λειτουργίες των φαινολικών ενώσεων, έχει μελετηθεί ευρέως η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα. Οι πολυφαινόλες αποτελούν αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά σε ένα ευρύ φάσμα χημικών οξειδωτικών συστημάτων. Έχουν την ικανότητα, για παράδειγμα, «σάρωσης» ριζών υπεροξυλίου, σουπεροξειδίου, υδροξυλίου σε υδατικά και οργανικά περιβάλλοντα. Με παρόμοιο τρόπο με αυτόν της βιταμίνης E, αυτή η δραστηριότητα οφείλεται σημαντικά στην ευκολία με την οποία ένα άτομο H από μια αρωματική υδροξυλική (OH) ομάδα μπορεί να δοθεί σε μια ελεύθερη ρίζα και στην ικανότητα μιας αρωματικής ένωσης να υποστηρίξει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Η στοιχειομετρία και οι κινητικές αυτών των αντιδράσεων επηρεάζονται από έναν αριθμό δομικών καθοριστών, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού και της θέσης των OH ομάδων, τον τύπο και τη θέση της γλυκοζυλίωσης και το βαθμό της στεरिकής παρεμπόδισης στην περιοχή της μετακίνησης του H.

Συγκεκριμένες πολυφαινόλες μπορεί να διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα σε βιολογικά συστήματα καθώς μειώνουν δείκτες οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA σε πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες, καθώς και σε μετασχηματισμένα κύτταρα (G.G. Duthie et al., 2000).



Πολλές μελέτες σε τρωκτικά υποστηρίζοντας την πιθανότητα συγκεκριμένες πολυφαινόλες να έχουν αντιοξειδωτική δράση in vivo, δείχνουν πως ενώσεις, όπως η ρουτίνη, και εκχυλίσματα κόκκινου κρασιού, τσαγιού και χυμών φρούτων πλούσιων σε φαινόλες, μειώνουν τα οξειδωτικά προϊόντα, όπως πρωτεϊνικά καρβονύλια, βλάβες σε βάσεις του DNA και μαλοναλδεύδη στο αίμα και σε ένα εύρος ιστών (Vertommen et al., 1994; Yoshina et al., 1994; Fremont et al., 1998; Roig et al., 1999).

Οι πολυφαινόλες, λοιπόν, έχουν την ικανότητα να «σαρώνουν» άμεσα ΔΜΟ και επιπλέον, να επάγουν την ενεργοποίηση του Nrf2, οδηγώντας στην ενεργοποίηση ποικίλων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Και οι δύο αυτές δράσεις συμβάλλουν στον παρεμπόδιση ανάπτυξης οξειδωτικού στρες (Na and Surh, 2008; Chuang and McIntosh, 2011).

### 3. Οίνος

Ο οίνος είναι ένα αλκοολούχο ποτό ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και αποτελεί προϊόν μερική ή ολικής ζύμωσης φρέσκων σταφυλιών ή του χυμού τους (OIV, 2012a). Το *Vitis Vinifera* L. είναι το πιο διαδεδομένο είδος σταφυλιού που χρησιμοποιείται για κρασί στον κόσμο (Baiano et al., 2013).

Το ενδιαφέρον για το προϊόν αυτό έγκειται αφενός στο ότι είναι ένα δημοφιλές ποτό που συνοδεύει και ενισχύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων, και αφετέρου γιατί αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν αντικατοπτρίζοντας την ποικιλία του εδάφους και του κλίματος ενός τόπου.



Εικόνα 13: Ο οίνος.

### 3.1. Ιστορικά

Η ιστορία του κρασιού χρονολογείται στα 6000 χρόνια π.Χ. Σύμφωνα με έναν αρχαίο Περσικό μύθο, το κρασί ήταν η τυχαία ανακάλυψη μια πριγκίπισσας που ήθελε να δώσει τέλος στη ζωή της πίνοντας αυτό που θεωρούσε για δηλητήριο. Αρχαιολογικά στοιχεία αποδεικνύουν η πρώτη παραγωγή οίνου έλαβε χώρα σε περιοχές της Γεωργίας και του Ιράν. Το παλαιότερο γνωστό οινοποιείο ( το 3000 π.Χ.) ανακαλύφθηκε σε μια ορεινή περιοχή στην Αρμενία. Οι Αιγύπτιοι ήταν οι πρώτοι που κατέγραψαν τη διαδικασία παραγωγής κρασιού σε πλάκες ή στους τύμβους τους. Ωστόσο, ο οίνος αποτελούσε προνόμιο των ανώτερων τάξεων.



Εικόνα 14: Ο οίνος στην αρχαιότητα.

Στην Αρχαία Ελλάδα, το κρασί εξυμνούνταν από τους ιστορικούς και τους καλλιτέχνες και διείσδυε σε όλες τις πτυχές της κοινωνικής ζωής: λογοτεχνία, μυθολογία, ιατρική, όμως, όπως και στην περίπτωση των Αιγυπτίων, οι απλοί πολίτες δεν το κατανάλωναν. Με τη Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία, η παραγωγή του κρασιού εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη και αυτό έγινε διαθέσιμο και στις χαμηλότερες τάξεις.

Η βιομηχανία του οίνου βίωσε μια ύφεση κατά το 17<sup>ο</sup> αιώνα, ενώ ο 19<sup>ος</sup> αιώνας αποτέλεσε χρυσή εποχή του κρασιού σε πολλές περιοχές, αν και το 1863 πολλά γαλλικά κτήματα υπέφεραν από μια ασθένεια που προκλήθηκε από την ψείρα *Phylloxera*. Όταν ανακαλύφθηκε πως τα κτήματα στην Αμερική ήταν ανθεκτικά στο έντομο αυτό, αποφασίστηκε η εισχώρηση Ευρωπαϊκών κτημάτων σε Αμερικανικά ριζώματα. Προέκυψαν, με αυτόν τον τρόπο, υβριδικά σταφύλια, τα οποία έδωσαν ως προϊόντα μεγαλύτερη ποικιλία κρασιών.

Τον τελευταίο αιώνα έχει γίνει μια επανάσταση στη βιομηχανία κρασιού, με την ανάπτυξη ισχυρού επιστημονικού background και καινοτομίας στον εξοπλισμό και την επεξεργασία του.

Στις μέρες μας καλλιεργούνται στην Ελλάδα γύρω στα 650.000 στρέμματα με κρασοστάφυλα που παράγουν 250.000.000 λίτρα κρασί, περίπου το 2% της συνολικής παραγωγής της Ευρωπαϊκής Ένωσης και το 1% της παγκόσμιας. Ο αριθμός των αμπελουργών είναι γύρω στου 100.000, ενώ ο αριθμός των οινοποιείων ξεπερνά τα 1000 ( Greek Gastronomy Guide, 2017).

### 3.2. Πολυφαινόλες στον οίνο

Ο οίνος αποτελείται από χημικά συστατικά τα οποία παίζουν καταλυτικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Πρόκειται για τα φαινολικά συστατικά του, τα οποία, λόγω των ιδιοτήτων τους, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κεφάλαια στην οινολογία.

Οι φαινολικές ενώσεις στον οίνο επηρεάζουν τη γεύση, το χρώμα (ανθοκυανίνες) και την στυφάδα (ταννίνες) του. Οι ανθοκυανίνες έχουν την τάση να δίνουν αδιάλυτα συσσωματώματα με το χρόνο και να σχηματίζουν ίζημα στη φιάλη, προκαλώντας μείωση της έντασης του χρώματος του οίνου.

Υπεισέρχονται στους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και ευθύνονται για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τη συντήρηση και παλαίωση. Τέτοιες μεταβολές είναι ο εξευγενισμός κατά την ωρίμανση υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά και το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις. Οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου, Σ., 1998).

Τα φαινολικά συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, ενώ δευτερεύουσα πηγή τους είναι το ξύλο των βαρελιών. Πολύ μικρές ποσότητές τους, τέλος, σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Ο ρόλος τους στο σταφύλι είναι κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακός, αλλά σε μικρότερο βαθμό προστατεύουν από τις προσβολές από έντομα και από την κατανάλωση από ζώα (Jackson, R. S., 2008).

Οι ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολύ μερισμένες ταννίνες), και οι ανθοκυανίνες, ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες, αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών παραγώγων. Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη του σταφυλιού και περνούν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση, κατά τις διάφορες τεχνικές παρασκευής των έγχρωμων οίνων.



### 3.2.1. Η θέση των φαινολικών συστατικών στο σταφύλι

Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς. Στις μαύρες ποικιλίες όμως, υπάρχουν ανθοκυανίνες και στη σάρκα, με αποτέλεσμα τα σταφύλια να είναι πολύ πλούσια σε χρώμα. Επίσης ανθοκυανίνες απαντώνται και στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης, αν και στην περίπτωση αυτή η κατανομή είναι διαφορετική, αφού κυριαρχεί η κυανιδίνη. Στην πλειοψηφία των λευκών σταφυλιών δεν υπάρχουν καθόλου ανθοκυανίνες, ενώ σε λίγες περιπτώσεις υπάρχουν απλώς ίχνη. Οίνοι που παράγονται αποκλειστικά από λευκές ποικιλίες και ονομάζονται "blanc de blancs" δεν πρέπει να περιέχουν καθόλου ανθοκυανίνες.

Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού. Καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν, καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο χώρο, προκαλώντας ζημιά στο κυτόπλασμα. Η συγκέντρωσή τους ακολουθεί θετική διαβάθμιση, από το εξωτερικό μέχρι το εσωτερικό μέρος των σταφυλιών. Τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στη σάρκα είναι περισσότερο χρωματισμένα σε σχέση με αυτά που είναι κοντά στην επιδερμίδα. Στα σταφύλια υπάρχει αντίθεση μεταξύ των ταννινών των γιγάρτων και των φλοιών. Στα γίγαρτα οι ταννίνες είναι τοποθετημένες στο εξωτερικό και το εσωτερικό τμήμα που προστατεύει το έμβρυο. Μπορούν να ελευθερωθούν στο εξωτερικό περιβάλλον μόνο σε περίπτωση διαλυτοποίησης του δερματίου.

Στους φλοιούς των σταφυλιών έχουν ταυτοποιηθεί τρία είδη ταννινών. Το πρώτο είναι οι ταννίνες που βρίσκονται στα χυμοτόπια, σχηματίζοντας πυκνές δέσμες στα κύτταρα που είναι κοντά στην επιδερμίδα, ενώ διαχέονται αραιά στα εσωτερικά κύτταρα του μεσοκαρπίου. Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης είναι αντίστροφη, αφού τα κύτταρα του εξωτερικού μέρους περιέχουν τις περισσότερες ταννίνες. Η δεύτερη ομάδα ταννινών είναι αυτές που βρίσκονται δεμένες με ισχυρούς δεσμούς στην πρωτεοφωσφολιπιδική μεμβράνη (τονοπλάστης), ενώ η τελευταία κατηγορία αφορά στις ταννίνες που είναι ενσωματωμένες στο τοίχωμα κυτταρίνης-πηκτίνης.

Η κατανομή αυτών των μορίων είναι απόλυτα ακόλουθη με τις αντιμυκητιακές τους ιδιότητες, καθώς σταματούν την μυκηλιακή ανάπτυξη των μυκήτων που στερούνται λακκάσης, που είναι το μοναδικό ένζυμο που έχει την ικανότητα να τα καταστρέψει χωρίς να απενεργοποιηθεί. Ο φλοιός επίσης περιέχει φαινολικά οξέα και φλαβονόλες στα χυμοτόπια των κυττάρων, ενώ τα φαινολικά οξέα είναι τα μοναδικά φαινολικά συστατικά της σάρκας (Ribereau- Gayon, P. et al., 2006).

### 3.3. Οινοποίηση

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, πολλές τεχνολογικές καινοτομίες έχουν προταθεί για την παραγωγή κρασιού, ωστόσο, για την καλύτερη κατανόηση των παραγόμενων κρασιών, αυτά ταξινομούνται σε συγκεκριμένες τάξεις με βάση συγκεκριμένα κριτήρια.

Με κριτήριο το χρώμα, διακρίνονται σε λευκά, ροζέ και ερυθρά. Ένα δεύτερο κριτήριο για την ταξινόμηση των κρασιών είναι η γλυκύτητα, η περιεκτικότητά τους, δηλαδή, σε σάκχαρα. Με βάση αυτή χωρίζονται σε ξηρά, ημίξηρα, ημίγλυκα και γλυκά. Τέλος, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε διοξείδιο του άνθρακα διακρίνονται σε ήσυχα, ημιαφρώδη και αφρώδη.

#### 3.3.1. Συγκομιδή

Τα φρέσκα και πλήρως ωριμασμένα σταφύλια προτιμώνται ως πρώτη ύλη για την οινοποίηση. Στα ψυχρά κλίματα, όπως στη βόρεια Ευρώπη και την ανατολική πλευρά των Ηνωμένων Πολιτειών η έλλειψη ικανοποιητικής θερμότητας για να παραγάγει την ωρίμανση μπορεί να απαιτήσει τη συγκομιδή των σταφυλιών προτού να φθάσουν στην πλήρη ωριμότητα. Η ανεπάρκεια ζάχαρης που προκύπτει μπορεί να διορθωθεί από την άμεση προσθήκη ζάχαρης ή από την προσθήκη συμπυκνωμένου χυμού σταφυλιών. Τα σταφύλια που αφήνονται ώστε να φθάσουν στην πλήρη ωριμότητα στην άμπελο ή που είναι μερικώς ξηρά από την έκθεση στον ήλιο μετά τη συγκομιδή εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη ως αποτέλεσμα της φυσικής απώλειας υγρασίας (όπως στην παραγωγή των κρασιών Malaga στην Ισπανία). Ένας ευεργετικός μύκητας, *Botrytis cinera*, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να επιταχύνει την απώλεια υγρασίας (όπως στην παραγωγή των Sauterne στη Γαλλία). Αυτά τα σταφύλια χρησιμοποιούνται για να παραγάγουν τους γλυκούς επιτραπέζιους οίνους. Ειδικές μέθοδοι που υιοθετούνται ώστε να παραχθούν αυτά τα κρασιά περιλαμβάνουν την προσθήκη διοξειδίου του θείου, τη χρήση μικρών δοχείων ζύμωσης κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, ή τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών με στόχο το σταμάτημα της ζύμωσης προτού να ζυμωθεί όλη η ζάχαρη.

Λόγω της επίδρασής του στη σύσταση των σταφυλιών, ο κατάλληλος συγχρονισμός της συγκομιδής είναι μεγάλης σπουδαιότητας. Η πρόωρη συγκομιδή οδηγεί στα λεπτά, χαμηλής περιεκτικότητας σε οινόπνευμα κρασιά, ενώ η καθυστερημένη συγκομιδή μπορεί να παραγάγει κρασιά με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ και χαμηλή οξύτητα. Η συγκομιδή μπορεί να ολοκληρωθεί σε ένα ή περισσότερα στάδια. Οι συστάδες σταφυλιών κόβονται από την άμπελο και τοποθετούνται σε κάδους ή σε κουτιά και έπειτα μεταφέρονται σε μεγαλύτερα εμπορευματοκιβώτια (μεγάλα βαρέλια στην

Ευρώπη, μεταλλικά ανοιχτά βαγόνια φορτίου στην Καλιφόρνια) για τη μεταφορά στην οينوποιία.

### **3.3.2. Θραύση**

Στη σύγχρονη μηχανοποιημένη παραγωγή κρασιού, τα σταφύλια συνήθως συνθλίβονται και αποσπάται το κοτσάνι τους συγχρόνως από έναν θραυστήρα, που αποτελείται από ένα διάτρητο κύλινδρο που περιέχει πτερύγια που περιστρέφονται με 600 έως 1.200 στροφές το λεπτό. Τα σταφύλια συνθλίβονται και πέφτουν μέσα από τις οπές του κυλίνδρου, οι περισσότεροι από τους μίσχους περνούν από το τέλος του κυλίνδρου. Ένας κυλινδρικός θραυστήρας μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Οι αρχαίες μέθοδοι με τα πόδια ή με τα παπούτσια εφαρμόζονται σπάνια.

Όταν κόκκινα σταφύλια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή άσπρου χυμού, όπως στην περιοχή της Καμπανίας στη Γαλλία, η θραύση ολοκληρώνεται με τη συμπίεση. Τα κόκκινα σταφύλια μερικές φορές εισάγονται ολόκληρα στις δεξαμενές, οι οποίες στη συνέχεια παραμένουν κλειστές. Η προκύπτουσα αναπνοή στα φρούτα καταναλώνει οξυγόνο και παράγει διοξείδιο του άνθρακα, με αποτέλεσμα την θανάτωση των κυττάρων του φλοιού, ο οποίος χάνει την ημι-διαπερατότητά του και επιτρέπει την εύκολη εξαγωγή χρώματος. Υπάρχει επίσης κάποια ενδοκυτταρική αναπνοή του μηλικού οξέος. Αυτή η διαδικασία αναπνοής είναι αργή και στις θερμές περιοχές μπορεί να οδηγήσει στα κρασιά χαμηλού χρώματος και οξύτητας, με διακριτικό άρωμα.

### **3.3.3. Ο διαχωρισμός του χυμού**

Δύο κύριες διαδικασίες υιοθετούνται ώστε να διαχωριστεί ο χυμός από τα στερεά. Ένα μεγάλο μέρος του χυμού μπορεί να εξαχθεί με την τοποθέτηση των συντετριμμένων σταφυλιών σε ένα κοντέινερ που έχει ένα ψεύτικο κατώτατο σημείο και συχνά ψεύτικες πλευρές. Η μάζα των συντετριμμένων σταφυλιών ονομάζεται μούστος, ένας όρος που χρησιμοποιείται επίσης για να αναφερθεί στο μη ζυμωμένος χυμό σταφυλιών, με ή χωρίς το φλοιό.

Συχνότερα, τα συντετριμμένα σταφύλια τοποθετούνται σε έναν πιεστήριο. Μία οριζόντια πρέσα που εφαρμόζει πίεση και στις δύο άκρες, αντικαθιστά βαθμιαία την παραδοσιακή πρέσα. Οι συνεχείς κοχλιωτές πρέσες επίσης χρησιμοποιούνται, ειδικά για τον αποστραγγιζόμενο πολτό.

### 3.3.4. Κατεργασία του μούστου

Οι λευκοί μούστοι είναι συχνά θολοί και είναι απαραίτητη η κατακάθιση των αιωρούμενων σωματιδίων, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους. Μέτρα όπως η προσθήκη διοξειδίου του θείου και η ελάττωση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της καθίζησης βοηθούν, ώστε να αποτραπεί η ζύμωση και επιτρέπουν στο αιωρούμενο υλικό να καθιζάνει κανονικά. Σε πολλές περιοχές οι οινοποιίες υποβάλλουν το λευκό μούστο σε φυγοκέντριση ώστε να αφαιρεθούν τα στερεά. Σε αυτήν την διαδικασία μια ισχυρή έλκυσσα δύναμη δημιουργείται από την κυκλική κίνηση. Οι μούστοι είναι μερικές φορές παστεριωμένοι, αδρανοποιώντας τα ανεπιθύμητα ένζυμα που προκαλούν την αμαύρωση. Η προσθήκη ενζύμων που διασπούν την πηκτίνη στους μούστους για να διευκολύνουν την πίεση, είναι ασυνήθης. Ο βεντονίτης, ένας τύπος αργίλου, μπορεί να προστεθεί στους μούστους για να μειώσει τη συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο και να διευκολύνει τη διευκρίνιση.



Εικόνα 15: Απεικόνιση του μούστου.

Τελευταία έχει ανανεωθεί το ενδιαφέρον για τη θερμική επεξεργασία των κόκκινων μούστων πριν τη ζύμωση ώστε να εξαχθεί χρώμα και να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα. Αυτή η διαδικασία όταν εκτελείται γρήγορα σε μέτριες θερμοκρασίες και χωρίς υπερβολική οξείδωση μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιθυμητή στην παραγωγή των κόκκινων γλυκών κρασιών, υιοθετώντας μικρές χρονικές περιόδους ζύμωσης στο φλοιό. Είναι επίσης κατάλληλη για τη χρήση στα κόκκινα σταφύλια που έχουν προσβληθεί από το παρασιτικό μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος περιέχει μεγάλη ποσότητα ενζύμων πολυφαινολικής οξειδάσης που προκαλούν την αμαύρωση.

### 3.3.5. Ζύμωση

Η διεργασία της αλκοολικής ζύμωσης απαιτεί προσεκτικό έλεγχο για την παραγωγή κρασιών υψηλής ποιότητας. Απαραίτητες προϋποθέσεις είναι ο περιορισμός της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, η παρουσία ικανού αριθμού επιθυμητών ζυμών, η παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη των

ζυμών, η θερμοκρασία της θερμοκρασίας για την αποφυγή υπερθέρμανσης, η αποτροπή της οξείδωσης και σωστή διαχείριση των επιπλέοντων φλοιών στους κόκκινους μούστους.

Η φλούδα των σταφυλιών καλύπτεται συνήθως από βακτηρίδια, μύκητες και ζύμες. Οι άγριες ζύμες όπως οι *Pichia*, *Kloeckera*, και *Torulopsis* είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα από τη ζύμη του κρασιού *Saccharomyces*. Παρά το γεγονός ότι είδη του *Saccharomyces* γενικά θεωρούνται πιο επιθυμητά για αποτελεσματική αλκοολική ζύμωση, είναι ζύμες από άλλα γένη να συνεισφέρουν στη γεύση, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Η ζύμη *Saccharomyces* προτιμάται γιατί είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη μετατροπή της ζάχαρης σε αλκοόλ και επίσης είναι λιγότερο ευπαθής στην ανασταλτική λειτουργία του αλκοόλ.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά την αλκοολική ζύμωση είναι απαραίτητος ώστε (1) να διευκολύνει την ανάπτυξη της ζύμης, (2) να εξαχθούν τα αρωματικά συστατικά και το χρώμα από τη φλούδα, (3) να επιτρέψει τη συσσώρευση των επιθυμητών παραπροϊόντων, και (4) να αποτρέψει την υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των ζυμών. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των πιο κοινών ζυμών που χρησιμοποιούνται στην οινοποιία είναι περίπου 25° C, και σε πολλές αμπελουργικές περιοχές με ψυχρότερα κλίματα, τα σταφύλια συνθλίβονται σε αυτή τη θερμοκρασία. Η ζύμωση σπάνια ξεκινά σε τόσο υψηλή θερμοκρασία γιατί είναι πολύ δύσκολη η διατήρησή της σε επίπεδα κάτω των 30° C κατά τη διάρκεια της.

Η επαφή με τον αέρα πρέπει να περιοριστεί ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Σε πολύ μεγάλα δοχεία ο όγκος του διοξειδίου του άνθρακα που αποβάλλεται είναι ικανός ώστε να αποτρέψει την είσοδο του αέρα. Σε μικρά δοχεία τοποθετούνται παγίδες που αποτρέπουν την είσοδο του αέρα αλλά αποτρέπουν και την έξοδο του διοξειδίου του άνθρακα. Οι παγίδες αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ζύμωσης όπου τα επίπεδα του αποβαλλομένου διοξειδίου του άνθρακα είναι χαμηλά. Μετά τη ζύμωση μικρές ποσότητες διοξειδίου του θείου προστίθενται ώστε να αποτρέψουν την οξείδωση. Ασκορβικό οξύ (50 με 100 mg ανά λίτρο) χρησιμοποιείται μερικές φορές ώστε να ελαττωθεί η οξείδωση με αποτέλεσμα και τη μείωση του απαιτούμενου θειικού οξέος ως αντιοξειδωτικό, αλλά δεν συνιστάται γενικά.

Οι φλούδες που επιπλέουν πάνω από το χυμό στη ζύμωση των κόκκινων σταφυλιών αναστέλλουν την εξαγωγή του αρώματος και του χρώματος και μπορεί να οδηγήσουν στην αύξηση της θερμοκρασίας σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα και μπορεί να οξοποιηθούν αν αφεθούν να ξηραθούν.

### 3.3.6. Επεξεργασία μετά τη ζύμωση

Με κατάλληλη σύνθεση του μούστου, είδος ζύμης, θερμοκρασία και άλλους παράγοντες, η αλκοολική ζύμωση σταματά όταν το διαθέσιμο ποσό της ζάχαρης που μπορεί να ζυμωθεί γίνεται πολύ χαμηλό (περίπου 0,1 τοις εκατό).

Η ζύμωση των κανονικών μούστων ολοκληρώνεται συνήθως σε δέκα έως τριάντα ημέρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το σημαντικότερο μέρος των κυττάρων της ζύμης θα βρεθεί σύντομα στο ίζημα, ή στα κατακάθια. Ο διαχωρισμός του επιπλέοντος κρασιού από τα κατακάθια καλείται *racking*. Τα δοχεία διατηρούνται πλήρη από αυτήν την περίοδο με "*topping*," μια διαδικασία που εκτελείται συχνά, γιατί η θερμοκρασία του κρασιού και κατά συνέπεια ο όγκος του, μειώνονται. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων, το *topping* είναι απαραίτητο κάθε εβδομάδα ή δύο. Αργότερα, μηνιαία ή οι διμηνιαία γεμίσματα είναι επαρκή.

### 3.3.7. Διαχωρισμός

Μερικά κρασιά αποβάλλουν μέρος τους (κύτταρα ζύμης, κομμάτια από τα σταφύλια, κ.λπ.) πολύ γρήγορα, και το επιπλέον κρασί παραμένει σχεδόν λαμπερό. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται τα ξύλινα βαρέλια των πενήντα γαλονιών που έχουν μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας όγκου από τα μεγαλύτερα δοχεία. Το τραχύ εσωτερικό του ξύλινου βαρελιού διευκολύνει την εναπόθεση του αποβαλλόμενου υλικού. Άλλα κρασιά, ιδιαίτερα στις θερμές περιοχές ή όταν χρησιμοποιούνται οι μεγάλες δεξαμενές, μπορούν να παραμείνουν κάπως νεφελώδη για μεγάλες περιόδους. Η αφαίρεση του αποβαλλόμενου υλικού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης καλείται διαχωρισμός. Οι σημαντικότερες διαδικασίες που συμπεριλαμβάνονται είναι ο εξευγενισμός, η διήθηση, η φυγοκέντριση, η ψύξη, η ιονική ανταλλαγή και η θέρμανση.

### 3.3.8. Εξευγενισμός

Ο εξευγενισμός είναι μια αρχαία πρακτική στην οποία ένα υλικό που βοηθά τον διαχωρισμό προστίθεται στο κρασί. Οι κύριες διαδικασίες που συμπεριλαμβάνονται είναι η προσρόφηση, χημική αντίδραση και προσρόφηση και ενδεχομένως φυσική κίνηση. Οι πρωτεΐνες και τα κύτταρα ζύμης προσροφώνται στους εξευγενιστικούς παράγοντες όπως ο βεντονίτης (ένας τύπος αργίλου, πυλού, που παράγεται κυρίως από ένα ορυκτό) ή η ζελατίνη. Οι χημικές αντιδράσεις που γίνονται με τις τανίνες και τη ζελατίνη μπορούν να ακολουθηθούν από την προσρόφηση των αποβαλλόμενων ενώσεων. Εάν ένα αδρανές υλικό, όπως το πυρίτιο, προστεθεί σε ένα νεφελώδες κρασί, κάποιος διαχωρισμός θα γίνει απλά από τη μετακίνηση των μορίων του αδρανούς

πυριτίου μέσα στο κρασί. Αυτή η δράση εμφανίζεται πιθανώς μέχρι ένα σημείο με την προσθήκη οποιουδήποτε εξευγενιστικού παράγοντα.

### **3.3.9. Διήθηση**

Η διήθηση είναι μια άλλη αρχαία πρακτική, και τα αρχικά φίλτρα αποτελούνταν από τις τραχιές καλυμμένες με ύφασμα οπές μέσω των οποίων χυνόταν το κρασί. Τα σύγχρονα ταμπόν των φίλτρων αποτελούνται από ίνες κυτταρίνης των διάφορων πορωδών υλικών ή αποτελούνται από μεμβράνες φίλτρων, επίσης σε μια σειρά πορωδών υλικών. Το μέγεθος των πόρων μερικών φίλτρων είναι αρκετά μικρό για να αφαιρέσει τα κύτταρα της ζύμης και τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα, αλλά τα φίλτρα λειτουργούν όχι μόνο λόγω του μεγέθους των πόρων αλλά και από ένα ορισμένο ποσό προσρόφησης.

### **3.3.10. Φυγοκέντριση**

Η φυγοκέντριση, ή περιστροφή σε μεγάλη ταχύτητα, που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τους μούστους, εφαρμόζεται επίσης στα κρασιά που είναι δύσκολο να διαχωριστούν με άλλα μέσα. Αυτή η λειτουργία απαιτεί προσεκτικό έλεγχο για να αποφευχθούν η αδικαιολόγητη οξείδωση και η απώλεια αλκοόλης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

### **3.3.11. Ψύξη**

Η ψύξη βοηθά το διαχωρισμό του κρασιού με διάφορους τρόπους. Η μείωση της θερμοκρασίας αποτρέπει συχνά και την ανάπτυξη ζύμης και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, η οποία τείνει να κρατήσει τα κύτταρα ζύμης ανασταλμένα. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι πιο διαλυτό στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Μια σημαντική αιτία θόλωσης είναι η αργή καταβίθωση του τρυγικού καλίου (κρέμα του τρυγικού) όπως ωριμάζει το κρασί. Η γρήγορη καταβίθωση προκαλείται με την πτώση της θερμοκρασίας σε εύρος από -7 έως -5° C για μια ή δύο εβδομάδες. Εάν το κρασί που προκύπτει φιλτραριστεί από το ίζημα του τρυγικού, η καταβίθωση του τρυγικού δεν θα προκαλέσει συνήθως να θόλωμα αργότερα.

### **3.3.12. Θέρμανση**

Πολλά κρασιά περιέχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών που μπορούν να προκαλέσουν θόλωμα είτε με καταβύθιση είτε με την αντίδραση με το χαλκό ή με άλλα μέταλλα που



σχηματίζουν συναθροίσματα τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν θολώματα. Η χρήση του βεντονίτη αφαιρεί κάποια πρωτεΐνη και η πρωτεϊνική προσρόφηση αυξάνεται εάν το κρασί είναι ζεστό όταν εξευγενίζεται. Η παστερίωση στους 70 με 82° C μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να κατακρημνίσει τις πρωτεΐνες, αλλά στη σύγχρονη πρακτική αυτή η διαδικασία υιοθετείται σπάνια για να βοηθήσει το διαχωρισμό.

### 3.4. Υποπροϊόντα Οινοποίησης

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες των στεμφύλων, λόγω των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων τους (αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή δράση κ.λπ.), οι οποίες βασίζονται κυρίως στη σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Τα στέμφυλα αποτελούνται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, δηλαδή τους βοστρύχους (κοτσάνια), τους φλοιούς και τα κουκούτσια (γίγαρτα). Είναι η φυτική βιομάζα που προκύπτει κατά τη διαδικασία οινοποίησης, μετά από την πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του μούστου. Είναι το κύριο, από άποψη όγκου και απομένουσας αξίας, υποπροϊόν της οινοποίησης.

Σύνθεση Στέμφυλων	Περιεκτικότητα εκφρασμένη σε ποσοστό%
<b>Φλοιοί</b>	<b>50</b>
<b>Γίγαρτα</b>	<b>20</b>
<b>Αλκοόλη</b>	<b>5</b>
<b>Υγρασία</b>	<b>25</b>
<b>Σύνολο</b>	<b>100</b>

Πίνακας 2: Η σύνθεση των στέμφυλων όπως εξέρχονται από τις δεξαμενές ζύμωσης- εκχύλισης.

Τα υποπροϊόντα οινοποίησης θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική πηγή για την πρόσληψη φυσικών αντιοξειδωτικών, τα οποία θεωρούνται απολύτως ασφαλή σε σύγκριση με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως τα BHA (butylated-hydroxyanisole) και BHT ( butylated- hydroxytoluene), συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων με ανεπιθύμητες επιδράσεις στα ένζυμα των οργάνων του ανθρώπου.



Τα στέμφυλα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε βιολειτουργικές πολυφαινόλες, ειδικά φλαβονοειδή, στιλβένια και φαινολικά οξέα. Κάποιες πολυφαινόλες εκχυλίζονται στο κρασί, όμως η πλειοψηφία τους παραμένει στα υποπροϊόντα της οινοποίησης (Kammerer et al., 2004).

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

Πίνακας 3: Οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg/g (Pinelo et al., 2006).

Μετά την επεξεργασία του κρασιού, τα υποπροϊόντα που λαμβάνονται αποτελούν, επίσης, μια πολύ φθηνή πηγή για εξαγωγή αντιοξειδωτικών φλαβονολών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα, ή στην παραγωγή φυτοχημικών παρέχοντάς, έτσι, ένα σημαντικό οικονομικό πλεονέκτημα ( Alonso et al., 2002; Negro et al., 2003; Gonzalez- Paramas et al., 2004).

Τα οινοποιητικά υποπροϊόντα, εκτός από το γεγονός ότι παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, λόγω όγκου και οργανικού φορτίου, αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Κατά την οινοποίηση παράγεται ένας πολύ μεγάλος όγκος στερεών αποβλήτων (στέμφυλα) που συνιστά το 17% του βάρους των χρησιμοποιούμενων σταφυλιών. Εκτεταμένη έρευνα έχει δείξει πως πολλά βιοδιασπώμενα οργανικά απόβλητα μπορούν να κομποστοποιηθούν με έναν εύκολο και οικονομικό τρόπο. Η κομποστοποίηση οργανικής ύλης είναι ένας απλός και αποτελεσματικός τρόπος μετατροπής των αγρο- βιομηχανικών αποβλήτων σε προϊόντα κατάλληλα για βελτιωτικά εδάφους ( Ferrer et al., 2001).

## **4. Πρόβατα Μοντέλα**

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries*), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας.

Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι γύρω στο 40%. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο.

Ανάλογα με την ηλικία και το φύλο τους, ονομάζονται αρνιά μέχρι δυο μηνών, ζυγούρια μέχρι ενός έτους, κριάρια τα ώριμα αρσενικά και προβατίνες τα θηλυκά. Έχουν μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκριζό. Ζουν 10 έως 14 χρόνια, ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσής τους. Τρέφονται με νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν σχεδόν αμάσητα, ώστε να εξασφαλιστούν κατά τη διάρκεια της ημερήσιας βοσκής οι μεγάλες ποσότητες που απαιτούνται. Αργότερα, όταν αναπαύονται, η τροφή επανέρχεται στο στόμα και αναμασάται.

### **4.1. Εγκυμοσύνη**

Τα πρόβατα θεωρούνται πολυγαμικά ζώα. Έτσι, στο κοπάδι, σε κάθε κριάρι πρέπει να αντιστοιχούν γύρω στις 30-50 προβατίνες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί κατά μέσο όρο 150 μέρες. Ο πρώτος τοκετός γίνεται σε ηλικία 14-17 μηνών ή 2 ετών. Τα θηλυκά γεννούν 1-2 ή σπανιότερα 3-4 μικρά, ύστερα από κύηση 5 μηνών. Οι προβατίνες γεννούν μόνο μια φορά τον χρόνο, αν και βιολογικά έχουν τη δυνατότητα να γεννούν κάθε 6-7 μήνες. Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε προβατίνα αναγνωρίζει το δικό της μικρό, ανάμεσα σε πλήθος άλλων, βάσει της μυρωδιάς των μικρών της. Τα πρόβατα ενηλικιώνονται σε 2 χρόνια αν είναι αρσενικά, και σε ένα χρόνο αν είναι θηλυκά.

## 4.2. Χιώτικο Πρόβατο

Το Χιώτικο πρόβατο, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, προήλθε από το ομώνυμο νησί της Χίου, στην περιοχή του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Αποτελεί διασταύρωση ομοιόμαλλου, λεπτούρου, ελληνικού πρόβατου με παχύουρο, αναμικόμαλλου, μικρασιάτικου πρόβατου. Τελικά, κατατάσσεται στα ομοιόμαλλα, παχύουρα πρόβατα. Λέγεται ότι παλαιότερα κτηνοτρόφοι της νήσου Χίου και της Ανατολίας, περιοχής της Μικράς Ασίας προχώρησαν σε προσμίξεις μεταξύ των ντόπιων φυλών και των φυλών Kivircik και Daglic. Το Χιώτικο πρόβατο είναι σχετικά μεγαλόσωμο με σωματικό βάρος προβατίνων 45-65 κιλά (105-155 λίβρες) και κριαριών 65-85 κιλά (145-200 λίβρες). Θεωρείται η καλύτερη ελληνική φυλή λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής. Ο χρωματισμός του είναι λευκός με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος στο κεφάλι γύρω από τα αυτιά, τα μάτια, στην κοιλιά και στα πόδια. Τα αρσενικά διαθέτουν κέρατα με μεγάλη σπείρα ενώ τα θηλυκά, όταν έχουν κέρατα, είναι μικρά σαν ένα εξόγκωμα. Το Χιώτικο πρόβατο έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για τη γενετική βελτίωση άλλων ελληνικών και ξένων φυλών με πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής



Εικόνα 16: Οι αναπτυσσόμενοι αμνοί στο χώρο των εγκαταστάσεων.

## 5. Βιολειτουργικές Ζωοτροφές

Τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της κτηνοτροφικής και ζωικής παραγωγής και την ευζωία των ζωικών οργανισμών, η ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών φυτικής και ζωικής προέλευσης, ως πρόσθετες ύλες, για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, αφού σε αυτά αποδίδεται μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών.

Ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου.

Στην ηλικία απογαλακτισμού τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα ενήλικα. Ως αποτέλεσμα, θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών που θα έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγηση, λοιπόν, αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt J et al., 2007).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχουν αποδείξει τις ευεργετικές ιδιότητες των υποπροϊόντων της οινοποίησης, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες ( I. Kafantaris et al., 2016; E. Kerasioti et al., 2017; N. Goutzourelas et al., 2015). Συγκεκριμένα, σε κοτόπουλα και χοιρίδια που χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης, παρατηρήθηκε ότι τα ζώα που λάμβαναν τα στέμφυλα είχαν καλύτερη οξειδοαναγωγική κατάσταση, αφού αύξαναν τη συγκέντρωση ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων (π.χ. GSH). Παράλληλα, μειώθηκε η λιπιδική και πρωτεϊνική οξείδωση σε ιστούς όπως ο τετρακέφαλος μυς και στο αίμα των ζώων (Kafantaris et al., 2016; Makri et al., 2017)

Με δεδομένα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, σχεδιάστηκε ένα πείραμα κατά το οποίο δημιουργείται μία βιολειτουργική ζωοτροφή με χρήση των πολυφαινολών από στέμφυλα και εισάγεται στην καθημερινή διατροφή προβάτων και ειδικότερα σε πρόβατα που βρίσκονται στα πρώτα στάδια μετά την γέννησή τους, όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.



*Εικόνα 17: Υποπροϊόντα οινοποιίας (στέμφυλα).*

Η βιολειτουργική ζωοτροφή έχει ως σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες αλλά και τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και την αύξηση της παραγωγικότητάς τους.

Τέλος, δεδομένου ότι τα υποπροϊόντα που παράγονται κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας του κρασιού είναι ρυπογόνα, μέσω της εκμετάλλευσής τους για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών μπορούμε να μειώσουμε ταυτόχρονα και τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από αυτά.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων οινοποίησης για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας, που θα χορηγηθούν σε πρόβατα νεαρής ηλικίας. Ο σκοπός της χορήγησης είναι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους άμυνας, και κατά συνέπεια η ευζωία τους και η αύξηση της ζωικής παραγωγής. Επιπλέον, η επεξεργασία των υποπροϊόντων οινοποίησης θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη εναπόθεσή τους.

Τα απαραίτητα πειράματα για τη διεξαγωγή της εργασίας έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.



## Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

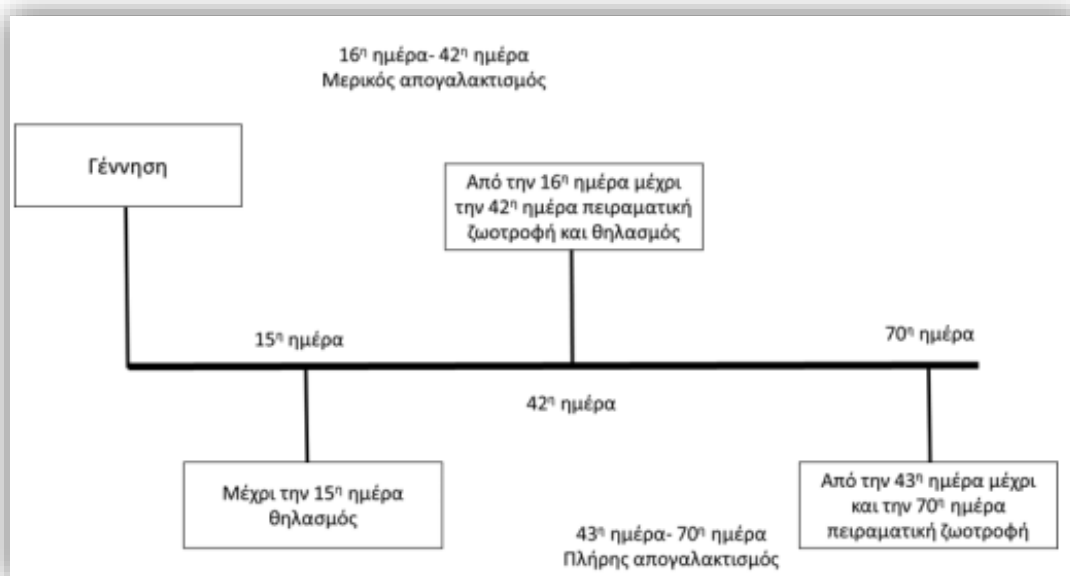
Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή 24 νεαρών προβάτων στο Ινστιτούτο Επιστήμης και Ζωικής Παραγωγής στα Γιαννιτσά Πέλλας, με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

### 1. Πειραματικός Σχεδιασμός

Για τα πειράματα που ακολούθησαν εκτράφηκαν 24 πρόβατα.

Τα πρόβατα ήταν της «Χιώτικης» Ελληνικής φυλής τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, με 12 πρόβατα ανά ομάδα, σε ομαδικά κελιά. Εκεί είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση τόσο στις πειραματικές ζωοτροφές όσο και μηδική (*Medicago sativa* - τριφύλλι).

Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και λάμβανε το σύνθετο σιτηρέσιο ανάπτυξης, ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και υποπροϊόντων οινοποίησης, σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά σιτηρέσια ήταν ισοενεργά, ισοπρωτεϊνικά, και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αμνών.



Εικόνα 18: Πειραματικό πλάνο εκτροφής προβάτων.



ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΜΕ ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ (ΟΜΑΔΑ Β)	
<b>ΖΩΟΤΡΟΦΗ</b>	%
<b>ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ</b>	45
<b>ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ</b>	9
<b>ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ</b>	21
<b>ΓΑΛΑ</b>	20
<b>ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ</b>	2,5
<b>ΑΛΑΣ</b>	0,5
<b>ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ</b>	1,2
<b>ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ</b>	0,8
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	100

Πίνακας 4: Η σύσταση των πειραματικών ζωοτροφών.

Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, τα πρόβατα βρίσκονταν με τις μητέρες τους. Στο διάστημα 15-42 ημερών τα πρόβατα θήλαζαν και ταυτόχρονα έτρωγαν τις πειραματικές ζωοτροφές. Τα πρόβατα απομακρύνονταν από τις μητέρες τους μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα για να πραγματοποιηθεί η σίτιση των μητέρων. Τις υπόλοιπες ώρες τα πρόβατα θήλαζαν και τρέφονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ειδικές ταΐστρες. Στο διάστημα μεταξύ 42-70 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός, απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα πρόβατα τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή. Κατά την εκτροφή των αμνών πραγματοποιήθηκε λήψη ιστών από την καρδιά, τον τετρακέφαλο μυ και τον εγκέφαλο στις 42 και 70 ημέρες.

## 2. Παραγωγή Σιτηρεσίου

### 2.1. Ενσίρωση

Ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους.

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία υψηλής πεπτικότητας και ικανοποιητικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πιο κατάλληλα φυτά που προσφέρονται για ενσίρωση είναι το καλαμπόκι και η μηδική. Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε αρχικά να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι.

Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή.

Τα βακτήρια τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Αυτά που είναι επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα. Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν και μετατρέπουν υδατάνθρακες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων. Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

### **2.1.1. Φάσεις Ενσίρωσης**

Για το ενσίρωμα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται ζυμώνουν τους υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες (WSC) στην καλλιέργεια σε γαλακτικό οξύ, και σε μικρότερο βαθμό σε οξικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η μείωση του pH του ενσιρωμένου υλικού οφείλεται στην παραγωγή αυτών των οξέων με αποτέλεσμα την αναστολή των μικροοργανισμών αλλοίωσης της τροφής. Η διαδικασία ενσίρωσης μπορεί να διαιρεθεί σε 4 φάσεις:

#### ***1<sup>η</sup> Φάση: Αερόβια Φάση***

Η φάση αυτή συνήθως διαρκεί μόνο λίγες ώρες στις οποίες το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μειώνεται λόγω της αναπνοής του φυτικού υλικού αλλά και των αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών, όπως ζύμες και εντεροβακτήρια. Επιπλέον, τα φυτικά ένζυμα όπως πρωτεάσες αλλά και ένζυμα που διασπούν υδατάνθρακες είναι ενεργά κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, εφόσον το pH εξακολουθεί να είναι εντός του φυσιολογικού εύρους για φρέσκο ενσίρωμα (pH 6.5-6.0).

## **2<sup>η</sup> Φάση: Φάση Ζύμωσης**

Αυτή η φάση ξεκινά όταν η ενσίρωση γίνεται αναερόβια, και συνεχίζεται για αρκετές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με τις ιδιότητες των προς ενσίρωση τροφών και τις συνθήκες αποθήκευσης τους. Αν η ζύμωση προχωρά με επιτυχία, αναπτύσσονται τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, και γίνονται ο κυρίαρχος πληθυσμός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Λόγω της παραγωγής γαλακτικού και άλλων οξέων το pH μειώνεται σε 3,8 - 5,0.

## **3<sup>η</sup> Φάση: Σταθερή Φάση**

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φάσης 2 σιγά-σιγά μειώνονται σε αριθμούς. Μερικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξύ επιβιώνουν σε αυτή τη φάση σε μια σχεδόν ανενεργή κατάσταση, άλλοι, όπως clostridia και bacilli επιβιώνουν ως σπόρια. Μόνο μερικές πρωτεάσες και καρβοϋδράσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο οξύ και κάποιοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, όπως *Lactobacillus buchneri* συνεχίζουν να είναι ενεργοί σε χαμηλό επίπεδο.

## **4<sup>η</sup> Φάση: Αερόβια Φάση Αλλοίωσης**

Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ενσιρώματος στην τροφή των ζώων αυτό είναι αναπόφευκτο, αλλά μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει νωρίτερα λόγω βλάβης του καλύμματος αποθήκευσης του ενσιρώματος. Η διαδικασία της αλλοίωσης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η έναρξη της φθοράς μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση των οργανικών οξέων, που συμβάλλουν στην διατήρηση, από ζύμες και περιστασιακά βακτήρια οξικού οξέος. Αυτό θα προκαλέσει μια αύξηση στο pH, και ως εκ τούτου το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως βάκιλλοι. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ωστόσο, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

Η είσοδος του αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμη και να εμποδίσει την επίτευξη σωστών επιπέδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της ενσιρωμένης τροφής. Είσοδος του αέρα αφού η διαδικασία της ενσίρωσης έχει φτάσει σε σταθερή κατάσταση θα οδηγήσει σε απώλεια της σταθερής κατάστασης

μέσω αναπνοής και τη περεταίρω μείωση των υδατανθράκων. Αυτό θα μικρύνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Όταν η ενσίρωση ενσωματώνεται σε ένα σύστημα καλλιέργειας, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγικότητα και την αποτελεσματικότητα χρησιμοποίησης των διαθέσιμων πόρων. Σε γενικές γραμμές, με τη χορήγηση ενσιρώματος αυξάνεται η παραγωγικότητα των ζώων, λόγω καλύτερης διατροφής και συνδυάζεται η γεωργική με την κτηνοτροφική κατεύθυνση της επιχείρησης.

### **2.1.2. Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος**

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητά σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

### **3. Πειραματικά Πρωτόκολλα**

#### **3.1. Ομογενοποίηση Ιστών**

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε Phosphate buffer (0.1M, pH=7.4) στο οποίο είχε προστεθεί ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Roche Diagnostics GmbH). Το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για 10sec (5x) για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (10.000g, 15 min, 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε προσδιορισμός της ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω βιοχημική τους ανάλυση.

#### **3.2. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικού Περιεχομένου- Bradford**

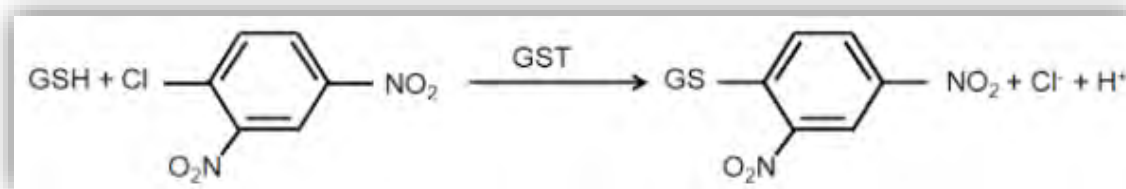
Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα, το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Lenaz G., 1998; Bradford MM., 1976).

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20μL αραιωμένου δείγματος (καρδιά 1:10, εγκέφαλος-τετρακέφαλος 1:5) προστίθενται κάθε φορά σε 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

### 3.3. Προσδιορισμός δραστηριότητας GST

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al ( Habig WH et al., 1974).

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100mM, pH 7.4) με 50μL GSH (1mM) και 20μL CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10μL του κυτοσολικού κυτταρόλυματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340nm για 3min. Εικόνα 10 Η αντίδραση της GSH με το CDNB. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλυμα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.



Εικόνα 19: Αντίδραση της GSH με το CDNB.

### 3.4. Προσδιορισμός δραστηριότητας SOD

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberley & Spitz ( Oberley LW et al., 1984) . Πιο αναλυτικά, 900μL SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2.24mM NBT; 10-4M ξανθίνη) αναμιγνύονται με ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια, σε 800μL SOD buffer προστίθενται 100μL του ολικού κυτταρόλυματος και ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

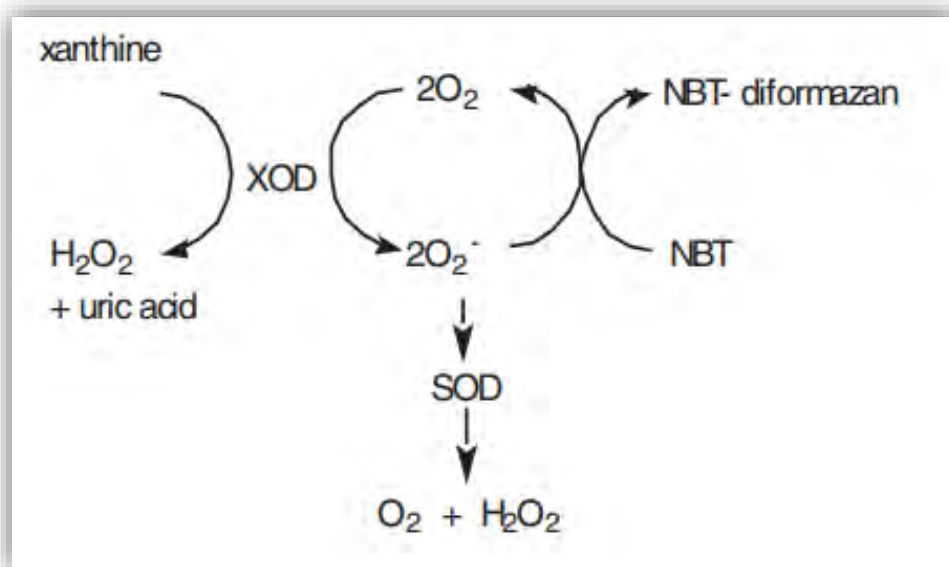
Η τιμή της αύξησης στην απορρόφηση (A) ανά λεπτό για το αρνητικό control και τα προς εξέταση δείγματα καθορίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\Delta A_{560 \text{ nm}} / \text{min} = (A_{560 \text{ nm}} \text{ final} - A_{560 \text{ nm}} \text{ initial}) / 3.5 \text{ min}$$

Το ποσοστό της αναστολής για κάθε δείγμα υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\% \text{ Inhibition} = [(\Delta A_{560 \text{ nm}} / \text{min}_{\text{negative control}} - \Delta A_{560 \text{ nm}} / \text{min}_{\text{sample}}) / \Delta A_{560 \text{ nm}} / \text{min}_{\text{negative control}}] \times 100$$

Η δραστηριότητα της SOD στα δείγματα των ιστών κανονικοποιήθηκε ως προς τη συνολική πρωτεΐνη, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford.



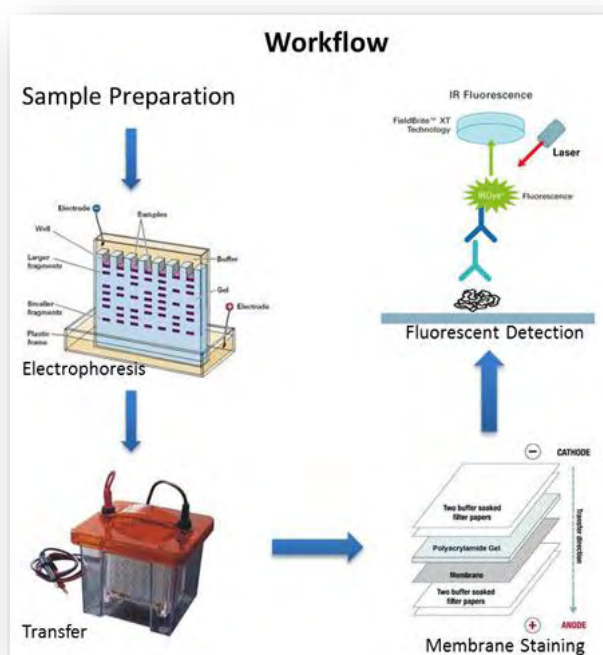
Εικόνα 20: Αντίδραση της SOD με το NBT.



### 3.5. Προσδιορισμός των επιπέδων της Συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης με ανοσοαποτύπωση Western

Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα ανοσο-αποτύπωσης πχ. ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (dot blot) και δυσδιάστατη ανοσοαποτύπωση (2D blot), αλλά το γνωστότερο είναι το κλασσικό ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Towbin et al., (1979) και έκτοτε έχει γίνει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους της έρευνας. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τρεις συνιστώσες για να ολοκληρωθεί: 1) διαχωρισμός βάσει μεγέθους, 2) μεταφορά σε στερεό υπόστρωμα και 3) σήμανση της πρωτεΐνης με το κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

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



Εικόνα 21: Η ακολουθία διαδικασιών της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης Western.

## **SDS- PAGE ηλεκτροφόρηση**

Η βασική ιδέα της ηλεκτροφόρησης είναι αρκετά απλή. Στηρίζεται στην αρχή της κίνησης φορτισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα πήκτωμα, το οποίο λειτουργεί ως ένας μοριακός ηθμός μακρομορίων. Κατά το διαχωρισμό τους αυτά διατάσσονται υπό μορφή ζωνών στο πήκτωμα.

Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στο σχηματισμό μακρών αλυσίδων πολυακρυλαμίδου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N,N'- μεθυλενο- δις- ακρυλαμίδης (bis). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου( APS) και του TEMED (N,N,N',N'- τετραμεθυλο- 1,2- διαμινιοιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι, σχηματίζεται ένα πλέγμα με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδου και bis και αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση του bis ως το πολυακρυλαμίδιο.

Σε μια τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες SDS- PAGE, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Πρωτεΐνες που αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαχωρίζονται με το SDS( απορρυπαντικό- αποδιατακτικός παράγοντας) στις υπομονάδες τους και με την ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της κάθε μίας και κατ' επέκταση να υπολογιστεί η σχετική ποσότητα πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα.

Το μίγμα που πρόκειται να διαχωριστεί μετακινείται από ένα πήκτωμα με μεγάλους πόρους (πήκτωμα «πακεταρίσματος», stacking gel) σε ένα πήκτωμα με μικρότερους πόρους που ακολουθεί (πήκτωμα διαχωρισμού, resolving gel). Το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες, αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μια μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσα από τους πόρους του πήκτωματος διαχωρισμού σε απόσταση αντιστρόφως ανάλογη με τη μάζα τους.

## **Πειραματική διαδικασία:**

### **1<sup>η</sup> Φάση: Ηλεκτροφόρηση**

Αρχικά, για την κατασκευή του πήκτωματος, φτιάχνεται το resolving και το stacking gel σε ειδικό τζάμι το οποίο τοποθετείται σε ένα Green Holder. Πρώτα προστίθεται το resolving gel και αφού αυτό πήξει, ακολουθεί η πρόσθεση του stacking gel, στο οποίο τοποθετείται μια ειδική χτένα, όσο ακόμα δεν έχει στερεωθεί το πήκτωμα, με τη

βοήθεια της οποίας θα δημιουργηθούν τα «πηγαδάκια» όπου θα φορτωθούν τα δείγματα. Αφού, λοιπόν, φτιαχτεί και το stacking gel γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων. Συνδυάζουμε δείγμα πρωτεΐνης και 5× ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (π.χ. 20 μl + 5 μl) σε έναν σωλήνα Eppendorf. Στη συνέχεια, βράζουμε για 3 λεπτά και φυγοκεντρούμε (spin down) για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο σε μικροφυγόκεντρο.

Τοποθετούμε το gel στη θήκη και τη βάζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γεμίζουμε τη θήκη με Running Buffer( ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή διάλυμα ηλεκτροδίων) και «φορτώνουμε» στα «πηγαδάκια» τα δείγματά μας(20μl), καθώς και ένα διάλυμα προτύπων μοριακού βάρους. Προσαρμόζουμε τα βύσματα του ηλεκτροδίου στα κατάλληλα ηλεκτρόδια και ηλεκτροφορούμε στα 150V για 60 λεπτά.

## **2<sup>η</sup> Φάση: Μεταφορά**

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση κλείνουμε την παροχή ρεύματος και απομακρύνουμε τη θήκη με τις πηκτές από τη συναρμολόγηση των ηλεκτροδίων, ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη (PVDF). Η «μετανάστευση», δηλαδή, των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, στην επιφάνεια της οποίας προσδένονται και ακινητοποιούνται με τη σειρά που διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα.

Κατά τη μεταφορά, στρώνονται σε μορφή “sandwich” κατά σειρά σε μια κασετίνα, τα εξής: ένα σφουγγάρι, χαρτί Whatman, το πήκτωμα, τη μεμβράνη, πάλι χαρτί Whatman και σφουγγάρι. Εκτός από τη μεμβράνη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα υπόλοιπα τα διαποτίζουμε με Transfer Buffer( ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς), αυτό που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά. Το πήκτωμα το αφαιρούμε από το τζάμι με τη βοήθεια μιας ειδικής σπάτουλας και το ακουμπάμε πάνω στο Whatman. Τη μεμβράνη την κόβουμε στις διαστάσεις του χαρτιού Whatman, τη βάζουμε σε μεθανόλη και στη συνέχεια σε νερό. Στη συνέχεια, την τοποθετούμε πάνω στο πήκτωμα. Προσθέτουμε το τελευταίο σφουγγάρι και κλείνουμε την κασετίνα. Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του sandwich μεταφοράς, τοποθετούμε την κασετίνα σε ειδική θήκη. Τη θήκη τη βάζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτουμε Transfer Buffer. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στον πάγο και ηλεκτροφορούμε στα 110V για 120 λεπτά.

### 3<sup>η</sup> Φάση: Ανοσοανίχνευση

Καθώς η ταυτοποίηση βασίζεται στην ειδική πρόσδεση αντισωμάτων σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή αντιγόνα, είναι πολύ σημαντική η ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη.

Οι μη ειδικές θέσεις καλύπτονται με την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα άπαχου γάλατος (σε μορφή σκόνης) και ρυθμιστικού διαλύματος, που περιέχει και απορρυπαντικό ( 50 ml TBST και 2.5g άπαχο γάλα, TBSTMS).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, λοιπόν, τοποθετούμε τη μεμβράνη σε 50 ml TBSTMS, καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και επωάζουμε στους 4° C για όλη τη νύχτα. Το **πρωτογενές αντίσωμα** (rabbit) στοχεύει στην πρωτεΐνη-στόχο(γ- GCL). Διαλύεται στο γάλα και η αραίωσή του είναι τέτοια ώστε να μην προσδέεται σε άλλες πρωτεΐνες που υπάρχουν στη μεμβράνη. Την επόμενη μέρα, λοιπόν, αφαιρούμε το παλιό γάλα και προσθέτουμε το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο στο γάλα για επώαση με ανάδευση για 1 ώρα. Ακολουθούν 5 πλύσεις με 1x TBST για 5 λεπτά η καθεμία.

Αφού ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη ώστε να απομακρυνθεί το μη-προσδεμένο αντίσωμα και να διασπαστούν οι ασθενείς μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος, η μεμβράνη επωάζεται με το **δευτερογενές αντίσωμα** (anti- rabbit), το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές, και συγκεκριμένα την Fc σταθερή περιοχή του, η οποία είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου στο οποίο παρασκευάστηκε το αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με ένα ένζυμο (horseradish peroxidase, HRP).

Προσθέτουμε, επομένως, στη συνέχεια το δευτερογενές αντίσωμα( σε 10ml TBST) και αναδεύουμε για 1 ώρα. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 λεπτών η καθεμία με 1x TBST. Όταν ολοκληρωθούν οι πλύσεις στεγνώνουμε τη μεμβράνη σε διηθητικό χαρτί και την επωάζουμε με το υπόστρωμα του ενζύμου για 5 λεπτά.

Η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα **ECL** (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Στη χημειοφωταύγεια, αυτή η διέγερση προκαλείται από μία χημική αντίδραση. Η luminol (diacylhydrazide) οξειδώνεται παρουσία HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρουσία χημικών ενισχυτών (φαινόλες) σε αλκαλικές συνθήκες και διεγείρεται. Το φως που εκπέμπεται ανιχνεύεται μέσω ενός ανιχνευτή εικόνων.

Ως εσωτερικό control χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH. Για την ανίχνευση της GAPDH μετά το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στη μεμβράνη προστέθηκε ειδικό αντίσωμα (συνδεδεμένο με HRP) για την πρωτεΐνη, πλύσεις με 1x TBST για 5 λεπτά η καθεμία και η ίδια διαδικασία που περιλαμβάνει το σύστημα ECL.

Όπως ακριβώς συμβαίνει και στην ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών, έτσι και στο ανοσοαποτύπωμα μπορεί να εξαχθεί όχι μόνο ποιοτική αλλά και ποσοτική πληροφορία. Για το σκοπό αυτό απαιτείται πυκνομέτρηση των επιμέρους ζωνών της μεμβράνης με λογισμικά πυκνομετρικής σάρωσης και επεξεργασίας εικόνας. Αφού σαρωθεί η μεμβράνη που φέρει το σήμα της ανοσοεντόπισης και αποθηκευτεί ως αρχείο κατάλληλης μορφής, επεξεργάζεται με τη βοήθεια λογισμικών πυκνομέτρησης τα οποία «ποσοτικοποιούν» κάθε ζώνη ενδιαφέροντος.

Η χρήση του εσωτερικού control είναι απαραίτητη, επειδή τουλάχιστον ένα ποσοστό της ποικιλότητας της έντασης μιας ζώνης ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα οφείλεται σε πειραματικούς χειρισμούς (πχ. ισοφόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα) κι όχι σε διαφορά των δειγμάτων. Ως τέτοιο control χρησιμοποιούνται “housekeeping genes” (GAPDH), η έκφραση των οποίων σταθερή στους ιστούς που μελετώνται.

### **Προπαρασκευαστικά- μητρικά διαλύματα ( stock buffers)**

#### 10x Running Buffer

- 60g Tris
- 288g glycine
- 200ml 10x SDS
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 2 λίτρα
- αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

#### 10x Transfer Buffer

- 60.6g Tris
- 288 glycine
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 2 λίτρα
- αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

#### 10x TBST

- 31.4g Tris
- 174g NaCl
- 40ml TWEEN
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 2 λίτρα
- αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

## **Διαλύματα Εργασίας ( working buffers)**

### 1x Running Buffer

- 1800ml ddH<sub>2</sub>O
- 200ml 10x Running Buffer
- Αποθήκευση στους 4° C

### 1x Transfer Buffer

- 1400ml ddH<sub>2</sub>O
- 200ml 10x Transfer Buffer
- 400ml μεθανόλη (διατήρηση πρωτεΐνης στη μεμβράνη)
- Αποθήκευση στους 4° C

### 1x TBST

- 1800ml ddH<sub>2</sub>O
- 200ml 10x TBST
- Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

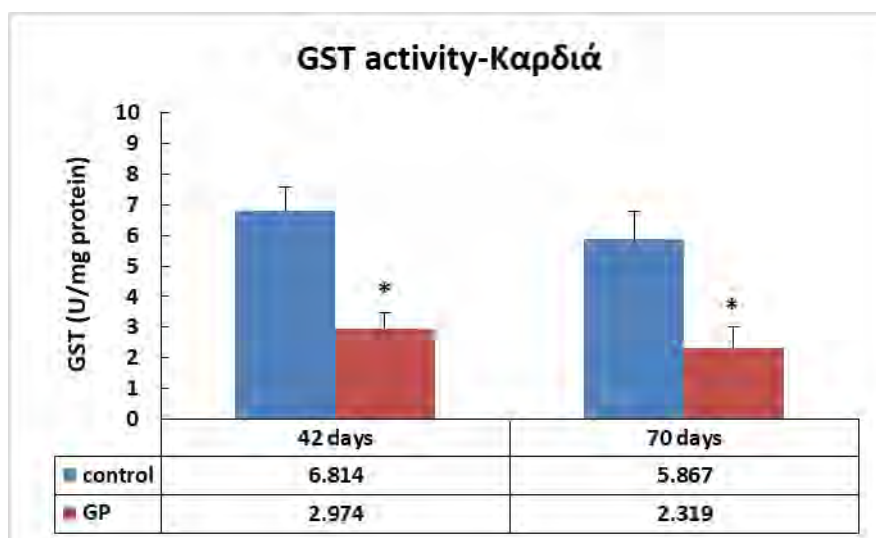
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μετρήσεις δραστηριότητας των ενζύμων και τα πρωτεϊνικά επίπεδα στους ιστούς που μελετήθηκαν (καρδιά, τετρακέφαλο μυ και εγκέφαλο). Με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών, συγκρίνονται οι τιμές μεταξύ των δυο ομάδων που αναφέρθηκαν, των control και αυτών που έχουν λάβει υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα- GP) κατά την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν  $MO \pm SEM$ .

### 1. Δραστηριότητα της GST

Κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GST παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στις 42 και στις 70 μέρες στον ιστό της καρδιάς. Στον τετρακέφαλο μυ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας, τόσο στις 42 όσο και στις 70 μέρες σε σχέση με την ομάδα control. Τέλος, στατιστικά σημαντική αύξηση της GST παρατηρήθηκε στις 70 μέρες στον ιστό του εγκεφάλου, ενώ στις 42 ημέρες, η δραστηριότητα του ενζύμου σε αυτόν το ιστό δε μεταβλήθηκε σημαντικά, στα ζώα που είχαν τραφεί με υποπροϊόντα οινοποίησης, σε σύγκριση με εκείνα που λάμβαναν την κοινή ζωοτροφή.

#### 1.1. Ιστός Καρδιάς

Συγκεκριμένα, στον καρδιακό ιστό, η δραστηριότητα της GST μειώθηκε κατά **56.4%** στις 42 μέρες και κατά **60.5%** στις 70 ημέρες.

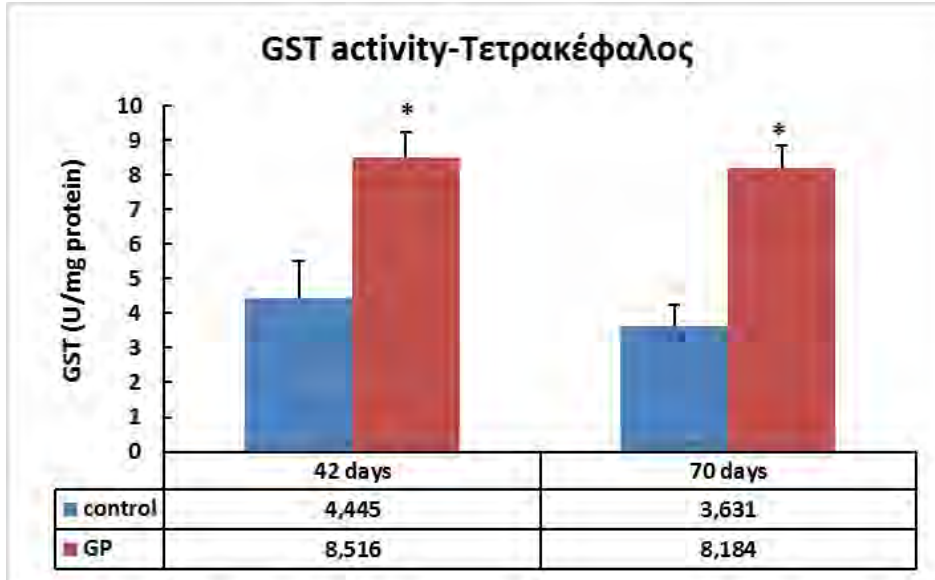


Διάγραμμα 1: Επίπεδα δραστηριότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP (grape pomace) στον καρδιακό ιστό κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές \* $p < 0.05$  ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.



## 1.2. Τετρακέφαλος Μυς

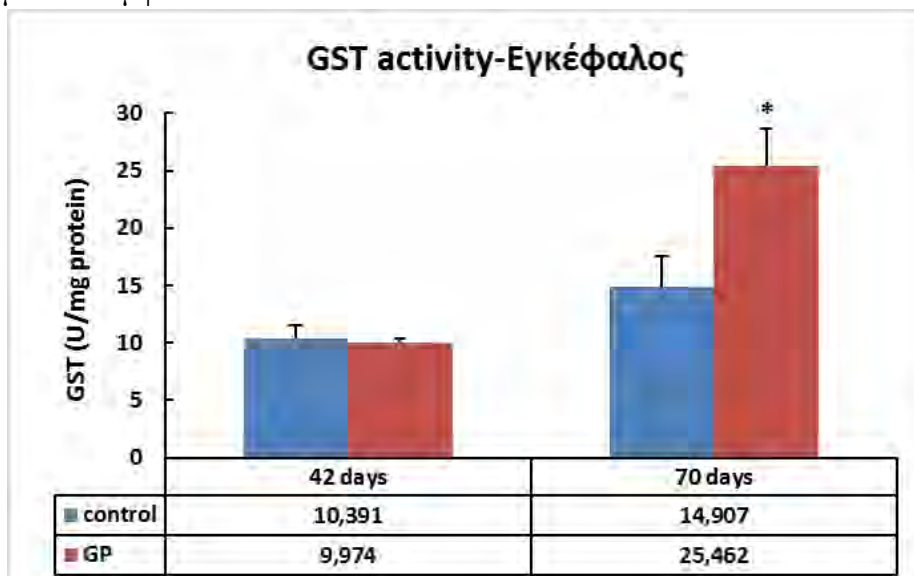
Η αύξηση της δραστηριότητας της GST που παρατηρήθηκε στον τετρακέφαλο μυ στις 42 μέρες ήταν της τάξης του **91, 6%**. Στις 70 μέρες η δραστηριότητα του ενζύμου στην ομάδα GP αυξήθηκε κατά **125, 4%**.



*Διάγραμμα 2:* Επίπεδα δραστηριότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP στον τετρακέφαλο μυ. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές \* $p < 0.05$  ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

## 1.3. Ιστός Εγκεφάλου

Στον εγκέφαλο, η στατιστικά σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητα της GST παρατηρήθηκε στις 70 μέρες, όπου αυξήθηκε κατά **70.8%** στα ζώα που έλαβαν την τροφή με τα στέμφυλα.



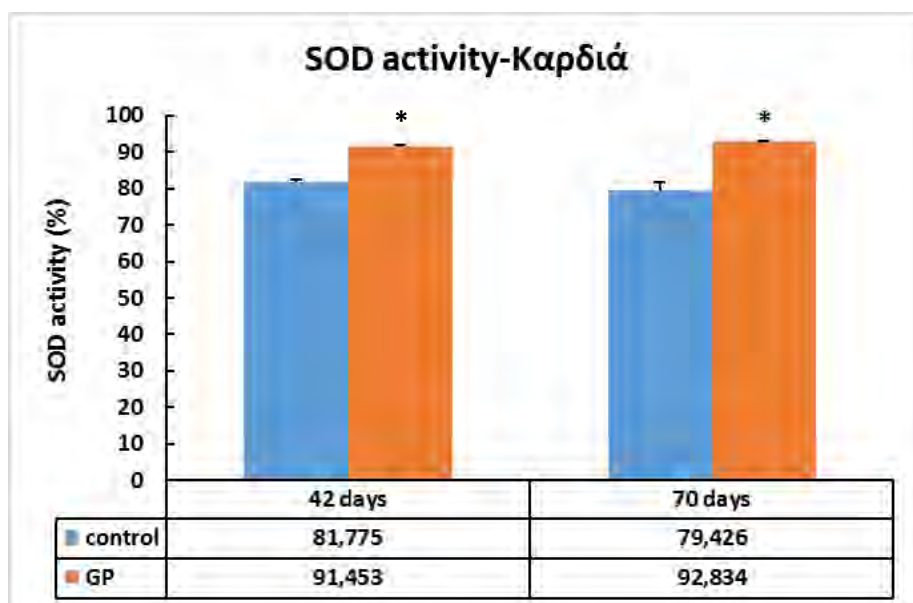
*Διάγραμμα 3:* Επίπεδα δραστηριότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP στον εγκέφαλο. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές \* $p < 0.05$  ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

## 2. Δραστικότητα της SOD

Κατά τον προσδιορισμό της δραστικότητας της SOD παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στους ιστούς της καρδιάς και του εγκεφάλου τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες. Ωστόσο, στον τετρακέφαλο μυ δε φάνηκε κάποια σημαντική μεταβολή στη δραστικότητα του ενζύμου στην ομάδα των ζώων που είχαν τραφεί με στέμφυλα.

### 2.1. Ιστός Καρδιάς

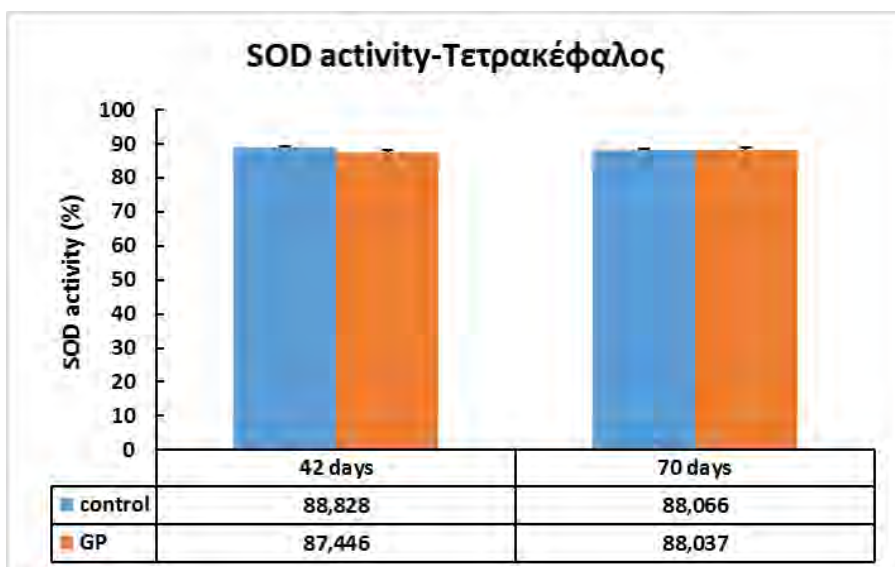
Στον καρδιακό ιστό, η δραστικότητα του ενζύμου της SOD αυξήθηκε κατά **11.9%** στις 42 μέρες και κατά **16.9%** στις 70 μέρες στην ομάδα GP.



Διάγραμμα 4: Επίπεδα δραστικότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP στον ιστό της καρδιάς. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές \* $p < 0.05$  ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές

## 2.2. Τετρακέφαλος Μυς

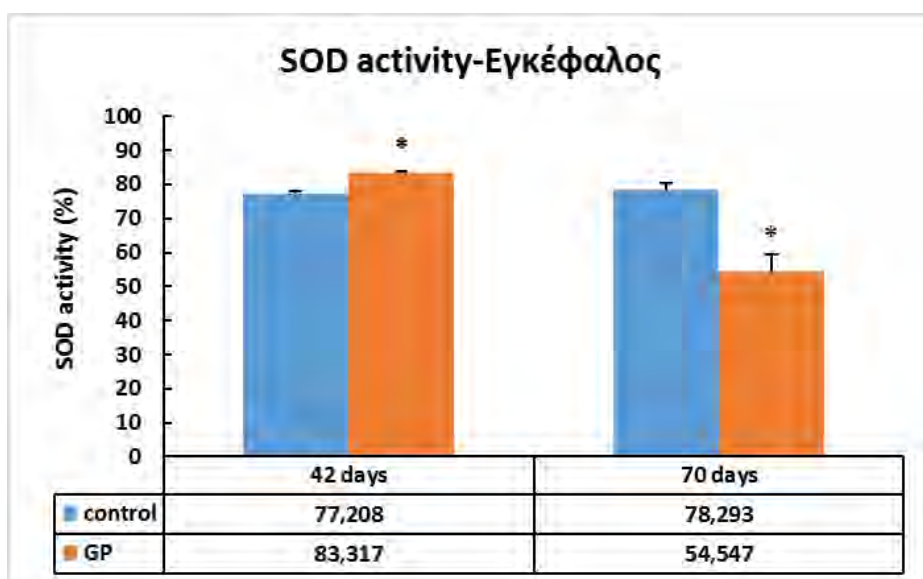
Στον τετρακέφαλο μυ, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου στην ομάδα GP σε σχέση με τα control.



Διάγραμμα 5: Τα επίπεδα δραστηριότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP στον τετρακέφαλο μυ.

## 2.3. Ιστός Εγκεφάλου

Οι μετρήσεις στον εγκέφαλο υπέδειξαν πως η δραστηριότητα της SOD αυξήθηκε κατά **7.9%** στην GP ομάδα στις 42 μέρες. Στις 70 μέρες, φάνηκε πως η δραστηριότητα του ενζύμου μειώθηκε κατά **30.3%** σε σχέση με τα control.



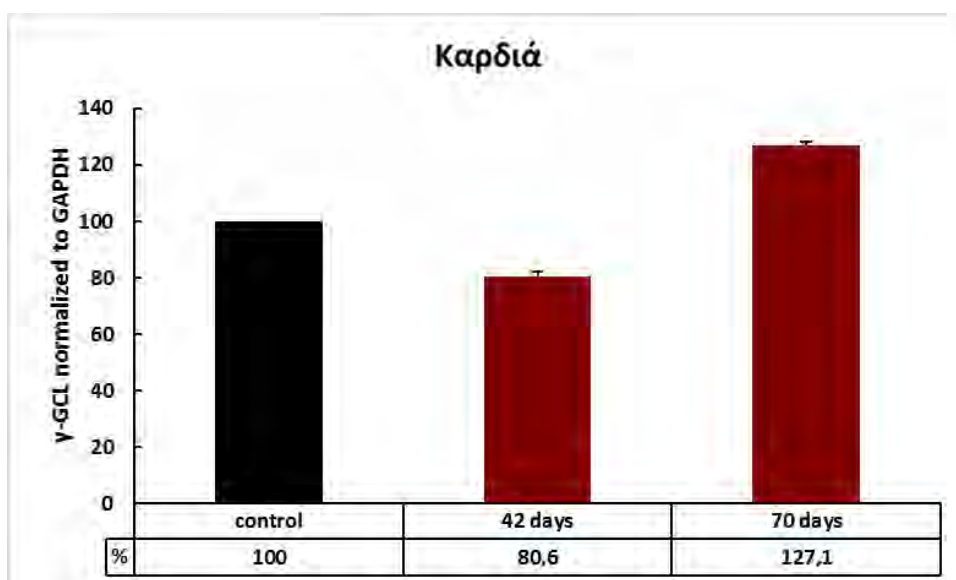
Διάγραμμα 6: επίπεδα δραστηριότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και GP στον εγκέφαλο. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές \* $p < 0.05$  ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές

### 3. Προσδιορισμός της $\gamma$ - GCL

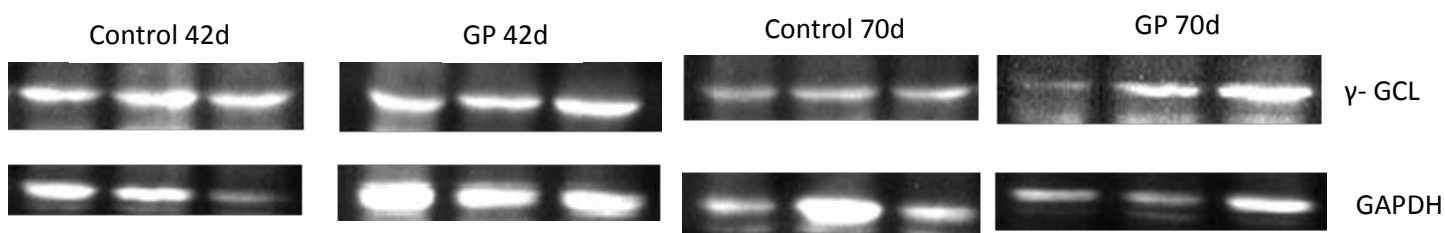
Η επίδραση των GP στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλοκυστεΐνης μελετήθηκε στην καρδιά, τον εγκέφαλο και τον τετρακέφαλο μυ τόσο στις 42 όσο και στις 70 μέρες. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σημειώθηκαν στον εγκέφαλο στις 42 μέρες και στον τετρακέφαλο μυ στις 70 μέρες.

#### 3.1. Ιστός καρδιάς

Στις 42 μέρες παρατηρήθηκε στην ομάδα GP μικρή μείωση (**19.4%**) των πρωτεϊνικών επιπέδων της  $\gamma$ - GCL, χωρίς να είναι σημαντική ( $p > 0.05$ ), ενώ στις 70 ημέρες παρατηρήθηκε μια τάση αύξησής της ( $p = 0.07$ , **27.1%**) στην ομάδα GP σε σχέση με την ομάδα control.



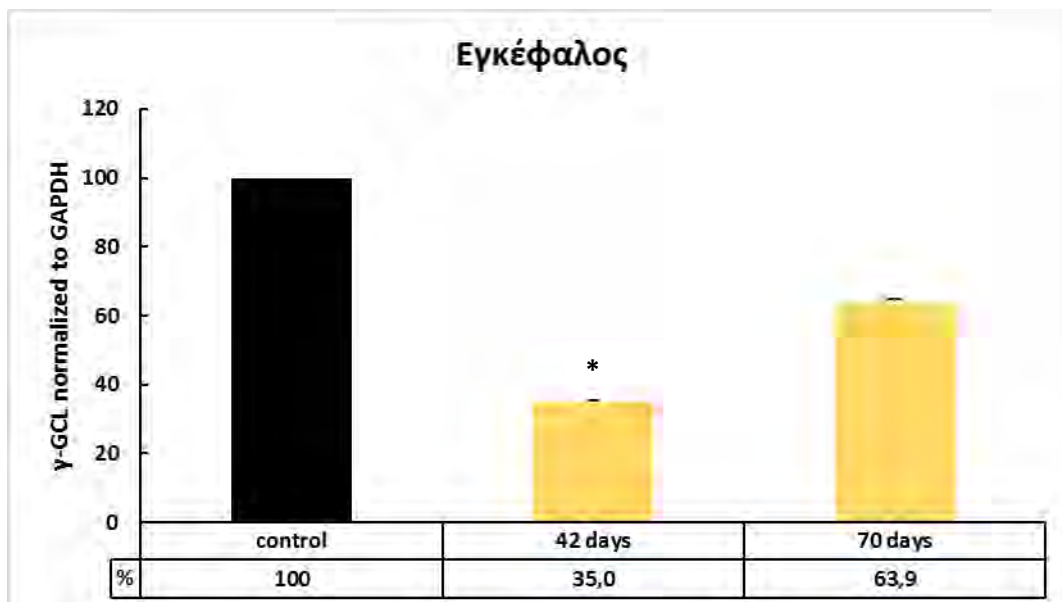
Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάσης της  $\gamma$ - γλουταμυλοκυστεΐνης ( $\gamma$ -GCL), στον καρδιακό ιστό προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



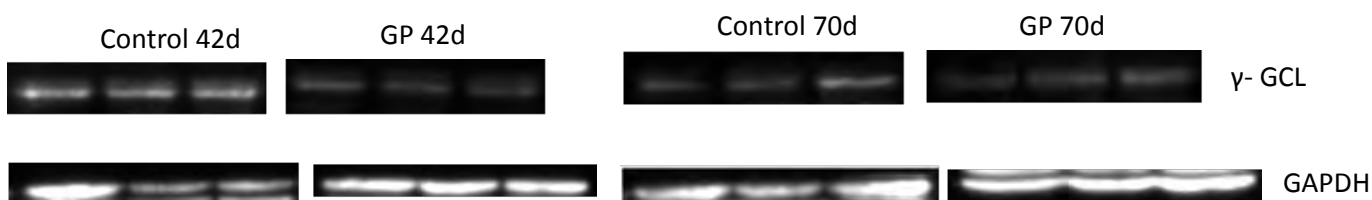
Εικόνα 22: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου της  $\gamma$ - γλουταμυλοκυστεΐνης (GCL), στον ιστό της καρδιάς προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.

### 3.2. Ιστός Εγκεφάλου

Στον εγκέφαλο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της  $\gamma$ -GCL στην ομάδα GP στις 42 μέρες (**34.9%**) και μία μικρότερη μείωση στατιστικά μη σημαντική στις 70 μέρες, σε σχέση με την ομάδα control.



Διάγραμμα 8: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της  $\gamma$ - γλουταμυλοκουστεΐνης ( $\gamma$ -GCL), στον ιστό του εγκεφάλου, προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



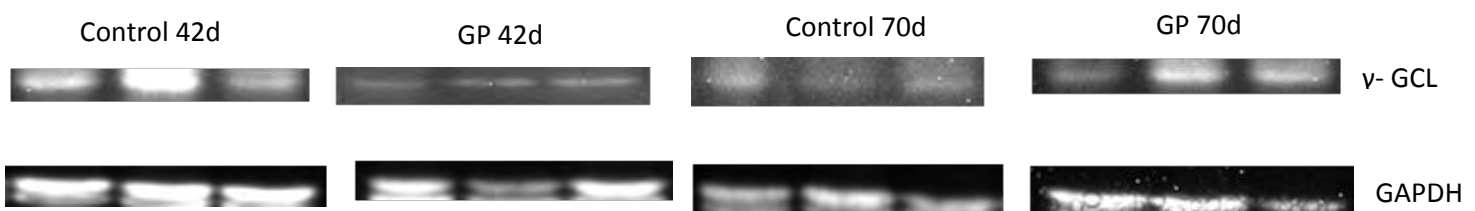
Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου της  $\gamma$ - γλουταμυλοκουστεΐνης (GCL), στον ιστό εγκεφάλου προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.

### 3.3. Τετρακέφαλος μυς

Στον τετρακέφαλο μυ, όπως φαίνεται και στις απεικονίσεις, σημειώθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της  $\gamma$ -GCL (48%) στα GP ζώα στις 70 μέρες σε σχέση με τα control, ενώ στις 70 μέρες μια μικρή μείωση της πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου συνθετάση της  $\gamma$ - γλουταμυλοκυστεΐνης ( $\gamma$ -GCL), στον ιστό του τετρακέφαλου μυ, προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών, με Western blot. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control.



Εικόνα 24: Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα Western που δείχνουν την επίδραση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην έκφραση του ενζύμου της  $\gamma$ - γλουταμυλοκυστεΐνης (GCL), στον ιστό τετρακέφαλου μυ προβάτων ηλικίας 42 και 70 ημερών. Ως εσωτερικό control, για κανονικοποίηση και έλεγχο φόρτωσης, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.

## Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οινική παράδοση στην Ευρώπη είναι προγενέστερη των Ρωμαίων: στην αρχαία Ελλάδα, ο οίνος υμνήθηκε από ποιητές, ιστορικούς και καλλιτέχνες· συχνές αναφορές στο κρασί συναντάμε στα έργα του Αισώπου και του Ομήρου. Στην Ελλάδα, ωστόσο, ο οίνος θεωρείτο προνόμιο των ανώτερων κοινωνικών τάξεων. Ο Διόνυσος, ο Έλληνας θεός του κρασιού, αντιπροσώπευε όχι μόνο την μεθυστική δύναμη του κρασιού αλλά και τις κοινωνικές και ευεργετικές του επιδράσεις. Θεωρείται κήρυκας του πολιτισμού, νομοθέτης και ειρηνοποιός, καθώς και προστάτης θεός της γεωργίας και του θεάτρου. Πράγματι, σύμφωνα με τον αρχαίο ιστορικό Θουκυδίδη «οι λαοί της Μεσογείου άρχισαν να εξέρχονται από τη βαρβαρότητα όταν έμαθαν να καλλιεργούν την ελιά και το αμπέλι».

Κατά την κλασική περίοδο, που περιλαμβάνει και το Χρυσό Αιώνα της Αθήνας με τη γέννηση της δημοκρατίας, της φιλοσοφίας και τη μεγάλη άνθιση των τεχνών, ο οίνος εντάχθηκε στην καθημερινή ζωή και στην κοινωνική συναναστροφή, μέσω ιδίως των περίφημων συμποσίων. Οι απαρχές της ιστορίας του ωστόσο στον Ελλαδικό χώρο τοποθετούνται χιλιάδες χρόνια πριν, καθώς αρχαιολογικές έρευνες εντόπισαν τα πρώτα ίχνη οινοποίησης στους Φιλίππους της Ανατολικής Μακεδονίας, κατά την προϊστορική περίοδο (γύρω στο 4.500 π.Χ). Η αρχαιοελληνική οινική παράδοση βρήκε τη συνέχειά της στη Ρωμαϊκή περίοδο, με την υιοθέτηση πολλών καλλιεργητικών και οινοποιητικών τεχνικών από τους Ρωμαίους, ενώ καταλυτική συμβολή στην ιστορική συνέχεια της αμπελουργίας και του οίνου είχε το Βυζάντιο και ο χριστιανισμός. Για μια χιλιετία, τα μοναστήρια θα αποτελέσουν κιβωτοί διαφύλαξης της αμπελοκαλλιέργειας και της οινοποίησης με τα οργανωμένα οινοποιεία που διαθέτουν.

Με το πέρασμα των αιώνων, η τέχνη της παραγωγής οίνου εξαπλώθηκε στη Γαλλία, την Ισπανία, την Γερμανία και τμήματα της Μεγάλης Βρετανίας. Μέχρι τότε, ο οίνος θεωρείτο σημαντικό κομμάτι της καθημερινής διατροφής και οι Ευρωπαίοι άρχισαν να προτιμούν πιο δυνατά και βαριά κρασιά.

Τα τελευταία 150 χρόνια, η παραγωγή οίνου γνώρισε μια επαναστατική μετεξέλιξη ως τέχνη και ως επιστήμη. Έχοντας πρόσβαση στην ψύξη, τα οινοποιεία διευκολύνθηκαν στον έλεγχο της θερμοκρασίας της διαδικασίας ζύμωσης και της παραγωγής οίνων υψηλής ποιότητας σε θερμά κλίματα. Η εισαγωγή μηχανημάτων συγκομιδής επέτρεψε στους οινοπαραγωγούς να αυξήσουν το μέγεθος των αμπελώνων τους και να τους κάνουν παραγωγικότερους.

Ο οίνος υπήρξε ανέκαθεν σημαντικό μέρος της διατροφής, της γαστρονομίας και της καλής διάθεσης, και μετεξελίχθηκε από σημαντική διατροφική πηγή σε ένα πολιτισμικό συμπλήρωμα του φαγητού.



Στο κρασί αποδίδονται από την αρχαιότητα ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες, τις οποίες η σύγχρονη επιστημονική έρευνα τεκμηριωμένα αποδίδει στην αντιοξειδωτική δράση ορισμένων συστατικών του.

Οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού ( όπως η ρεσβερατρόλη, το υδροξυκινναμικό οξύ, η κατεχίνη) έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες που τις καθιστά βιολογικά συστατικά. Εκτός από το ίδιο το κρασί, και τα στέμφυλα, παραπροϊόντα της οινοποίησης, περιέχουν σημαντική ποσότητα φαινολικών ενώσεων.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι στα εκτρεφόμενα ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με τη ζωική παραγωγή και την ευημερία (D.K. Gessner et al., 2016). Συνεπώς, έχει προταθεί η χορήγηση στα εκτρεφόμενα ζώα αντιοξειδωτικών για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στις ευεργετικές επιδράσεις των στέμφυλων στην υγεία των ζώων, κυρίως χάρη στην αντιοξειδωτική τους δράση που οφείλεται στο υψηλό περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες ( S. Dermeche et al., 2016; A. Apostolou et al., 2013; Y. Xu et al., 2016).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι τροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση προβάτων ( I. Kafantaris et al., 2016). Σκοπός, επομένως, της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδραση της ενσιρωμένης ζωοτροφής από υποπροϊόντα οινοποίησης σε 24 πρόβατα της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα» τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους, παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, Α και Β, σε ομαδικά κελιά. Είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση τόσο στις πειραματικές ζωοτροφές, όσο και σε μηδική (τριφύλλι) για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε σύνηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και υποπροϊόντων οινοποίησης, σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου.

Οι ιστοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν η καρδιά, ο εγκέφαλος και ο τετρακέφαλος μυς των νεαρών προβάτων. Μετρήθηκε η δραστηριότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase-SOD) και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase-GST), καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάσης της  $\gamma$ - γλουταμυλοκυστεΐνης ( GCL).

Στην GP ομάδα, στον ιστό του εγκεφάλου τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα της GST στις 70 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η GST είναι ένα ένζυμο της φάσης II του μεταβολισμού και είναι υπεύθυνη για την αποτοξικοποίηση των ξеноβιοτικών και ηλεκτρονιόφιλων ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς, καταλύοντας τη σύζευξη με τη θειολική ομάδα της ανηγμένης

γλουταθειόνης (GSH) (S.S. Singhal et al., 2015). Στις 42 ημέρες στον ιστό αυτό παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης της  $\gamma$ -GCL στην GP ομάδα. Η συνθετάση της  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεΐνης αποτελεί το πρώτο ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της GSH. Η σύνθεση της γλουταθειόνης από τα αμινοξέα της περιλαμβάνει 2 ενζυματικά βήματα: το σχηματισμό της  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεΐνης από γλουταμικό και κυστεΐνη (ρυθμοκαθοριστικό βήμα) που καταλύεται από τη  $\gamma$ -GCL, και το σχηματισμό της GSH από  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεΐνη και γλυκίνη, που καταλύεται από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) (P. Maher, 2015). Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, ωστόσο, στον ίδιο ιστό, έδειξε ότι τα επίπεδα της GSH δε διέφεραν μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των GP ομάδων (I. Kafantaris et al., 2016). Μια πιθανή εξήγηση για τη μείωση των επιπέδων της  $\gamma$ -GCL χωρίς αντίστοιχη μείωση αυτών της GSH μπορεί να είναι ότι ο σχηματισμός της GSH στον ιστό του εγκεφάλου ακολουθεί κάποιο άλλο μονοπάτι το οποίο δε βασίζεται στη *de novo* σύνθεση. Ένζυμα που συμμετέχουν στον βιοσυνθετικό κύκλο της GSH, όπως η ρεδοκτάση (GR) και η περοξειδάση (GPx) της γλουταθειόνης, μπορούν επίσης να συμμετέχουν στην «αναγέννηση» της GSH (Kerasioti et al., 2018). Στα ζώα που είχαν λάβει τροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα παρατηρήθηκε επίσης στον εγκέφαλο σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της SOD στις 42 ημέρες. Αντίθετα, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, όπου σε πρόβατα είχε χορηγηθεί ζωοτροφή εμπλουτισμένη τόσο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, όσο και με στέμφυλα η δραστηριότητα της SOD δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε κανένα υπό μελέτη, ιστό (Kerasioti et al., 2018). Η SOD είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει τις ενδοκυτταρικές ρίζες σουπεροξειδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι στο οξειδωτικό στρες. Η δράση της είναι παρούσα στο κυτοσόλιο, τα μιτοχόνδρια, το ολικό κυτταρόλυμα (A. Carlouz et al., 1986; I. Fridovich, 1986).

Στον ιστό του τετρακέφαλου μυ στην ομάδα GP, στις 42 ημέρες η δραστηριότητα της GST αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σημαντικά αυξημένη δράση της GST στον τετρακέφαλο παρατηρήθηκε και στις 70 ημέρες στην GP ομάδα, μαζί με παράλληλη σημαντική αύξηση των επιπέδων της  $\gamma$ -GCL. Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου τα αποτελέσματα έδειξαν στον ίδιο ιστό στις 70 ημέρες σημαντική αύξηση της GSH (I. Kafantaris et al., 2016), όπως θα αναμέναμε από τα αυξημένα επίπεδα της  $\gamma$ -GCL. Αυτός ο συνδυασμός της αυξημένης δραστηριότητας της GST, αλλά και των αυξημένων επιπέδων της GSH, ενός από τα σημαντικότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά, καθώς και των αυξημένων πρωτεϊνικών επιπέδων της  $\gamma$ -GCL, υποδηλώνει αυξημένη ικανότητα αποτοξίνωσης του ζώου και καλύτερη προστασία του. Η δραστηριότητα της SOD δεν επηρεάστηκε στον ιστό του τετρακέφαλου μυ σε καμία από τις δύο χρονικές στιγμές, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί

σε άλλους ιστούς προβάτων που λάμβαναν ζωοτροφή με στέμφυλα, και από προηγούμενη εργαστηριακή μελέτη (Kerasioti et al., 2018).

Όσον αφορά τον ιστό της καρδιάς παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα της SOD και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες) στην ομάδα των ζώων που έλαβαν τροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα της  $\gamma$ -GCL, καθώς και από προηγούμενη μελέτη τα επίπεδα της GSH δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στην καρδιά (Kafantaris et al., 2016), ενώ η δραστηριότητα της GST μειώθηκε σημαντικά τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες στην GP ομάδα σε σχέση με την ελέγχου. Πιθανόν να συμβάλουν άλλα ένζυμα στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού (Kerasioti et al., 2018).

Γενικά όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, παρατηρήθηκαν ιστο-ειδικά αποτελέσματα, αφού ο κάθε ιστός (καρδιά, εγκέφαλος, τετρακέφαλος μυς) φαίνεται να έχει διαφορετική απόκριση στην διατροφική παρέμβαση που ακολουθήθηκε με την προσθήκη των στεμφύλων. Οι παραπάνω ευεργετικές επιδράσεις των στεμφύλων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κάθε ιστού των προβάτων αποδίδεται πιθανώς στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (M. Pinelo et al., 2006; E. Frankel et al., 2013). Έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες ρυθμίζουν τη δραστηριότητα ενζύμων των φάσεων I και II του μεταβολισμού και συγκεκριμένα αυτά που σχετίζονται με τη GSH (V.E. Steele et al., 2000).

Συμπερασματικά, η χορήγηση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με υποπροϊόντα οινοποίησης σε πρόβατα νεαρής ηλικίας φαίνεται να ενισχύει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ζώων, αφού αυξάνει τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της GST και SOD και την πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου που συμμετέχει στη σύνθεση της γλουταθειόνης, του πιο σημαντικού ενδογενούς αντιοξειδωτικού. Συνεπώς βελτιστοποιεί το οξειδοαναγωγικό προφίλ και την ευημερία των ζώων, όπου μελέτες έχουν δείξει ότι σε νεαρή ηλικία αυτά υποφέρουν από ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (π.χ. μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία κλπ.) (Lykkesfeldt J. et al., 2007; Chan et al., 2013). Ωστόσο, φαίνεται πως αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις είναι ιστοειδικές, πιθανόν λόγω των φυσιολογικών και βιοχημικών διαφορών, καθώς και των διαφορών στο περιεχόμενο αντιοξειδωτικών ενζύμων και μορίων μεταξύ διαφορετικών ιστών. Πολύ σημαντικό γεγονός είναι ότι επιτυγχάνεται παράλληλα η αξιοποίηση των υποπροϊόντων οινοποίησης, η επεξεργασία των οποίων μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται απ' την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

## Βιβλιογραφία

- Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015.
- J. Shaikhali, I. Heiber, T. Seidel, E. Ströher, H. Hiltcher, S. Birkmann, K.J. Dietz, M. Baier, The redox sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes, BMC Plant Biol. 26 (8) (2008) 48.
- Volodymyr I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, Chemico-Biological Interactions 224 (2014) 164–175.
- H.M. Semchyshyn, L.M. Lozinska, Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase, FEMS Yeast Res. 12 (2012) 761–773.
- M.Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 1161–1208.
- V.J. Thannickal, B.L. Fanburg, Reactive oxygen species in cell signaling, Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 279 (2000) L1005–L1028.
- M. Valko, C.J. Rhodes b, J. Moncola, M. Izakovic a, M. Mazura, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, Chemico-Biological Interactions 160 (2006) 1–40.
- C.J. Lowenstein, J.L. Dinerman, S.H. Snyder, Nitric-oxide- a physiological messenger, Ann. Intern. Med. 120 (1994) 227–237.
- C.E. Griguer, Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells, Cancer Res. 66 (2006) 2257–2263.
- J. Nanduri, D.R. Vaddi, S.A. Khan, N. Wang, V. Makerenko, N.R. Prabhakar, Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2a degradation by intermittent hypoxia, PLoS One 8 (2013) e75838.
- E.M. Conner, M.B. Grisham, Inflammation, free radicals, and antioxidants, Nutrition 12 (1996) 274–277.
- J.E. Klaunig, Y. Xu, S. Bachowski, J. Jiang, Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis, in: K.B. Wallace (Ed.), Free Radical Toxicology, Taylor & Francis, London, 1997, pp. 375–400.
- François Gagné: *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*, 2014
- Manuel T. Velasquez: *Chronic Renal Disease*, 2015
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, 1999.
- A. Godic, B. Poljsak, M. Adamic, R. Dahmane, The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, Oxid. Med. Cell. Longev. 2014 (2014).
- K.H. Cheeseman, T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry, Br. Med. Bull. 49 (1993) 481- 493.
- B. Poljsak, I. Milisav, The neglected significance of 'Antioxidative Stress', Oxid. Med. Cell. Longev. 2012 (2012).

- C.A. Hitchon, H.S. El-Gabalawy, Oxidation in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 6 (2004) 265-278.
- W.C. Willett, The Mediterranean diet: science and practice, *Public Health Nutr.* A 9 (2006) 105-110.
- R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586.
- Y.B. Ji, T.P.M. Akerboom, H. Sies, J.A. Thomas, S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione, *Arch. Biochem. Biophys.* 362 (1999) 67–78.
- H. Karoui, N. Hogg, C. Frejaville, P. Tordo, B. Kalyanaraman, Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite- ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6000–6009.
- C. Hwang, A.J. Sinskey, H.F. Lodish, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum, *Science* 257 (1992) 1496–1502.
- D.P. Jones, J.L. Carlson, V.C. Mody, J.Y. Cai, M.J. Lynn, P. Sternberg, Redox state of glutathione in human plasma, *Free Rad. Biol. Med.* 28 (2000) 625–635.
- W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 47-95.
- J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I.N. De Castro, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595–603.
- J.M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049-6055.
- G.N. Landis, J. Tower, Superoxide dismutase evolution and life span regulation, *Mech. Ageing Dev.* 126 (2005) 365–379.
- Aurelia Magdalena Pisoschi, Aneta Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (2015) 55- 74.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983;220:472–477.
- Townsend DM. S-Glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol. Interv* 2007;7(6):313–324.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr* 2004;134(3):489–492.
- Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med* 1999;27(9–10):922–935.
- Griffith OW, Mulcahy RT. The enzymes of glutathione synthesis:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* 1999;73:209–267.
- Yang Y, Chen Y, Johansson E, Schneider SN, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP. Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochem. Pharmacol* 2007;74(2): 372–381.
- Hicks LM, Cahoon RE, Bonner ER, Rivard RS, Sheffield J, Jez JM. Thiol-based regulation of redoxactive glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2007;19(8):2653–2661.
- Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J* 2000;16(3):534–554.

- Wild AC, Mulcahy RT. Regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic. Res* 2000;32(4):281–301.
- Dewick PM (1997) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Laura Bravo. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, Vol. 56, No. 11 November 1998: 317–333.
- Wink, M., 1997: Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Advanced Botany Research* 25, 141–169.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747.
- Tangney, C. C.; Rasmussen, H. E., 2013: Polyphenols, inflammation and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*
- Chesson A, Russell WR & Provan GJ (1997) Metabolites of the phenylpropanoid pathway- common origin, common properties. In *Polyphenols in Foods*, pp. 17–23. Luxembourg: Office for Official Publication of the European Communities.
- Araújo, J.R.; Gonçalves, P.; Martel, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* 2011, 31, 77–87.
- Mocanu, M.-M.; Nagy, P.; Szöllősi, J. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. *Molecules* 2015, 20, 22578–22620.
- Lewandowska, H.; Kalinowska, M.; Lewandowski, W.; Stępkowski, T.M.; Brzóska, K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J. Nutr. Biochem.* 2015, 32, 1–19.
- Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* 2007, 18, 427–442.
- González-Vallinas, M.; González-Castejón, M.; Rodríguez-Casado, A.; Ramírez de Molina, A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy; a complementary approach with promising perspectives *Nutr. Rev.* 2013, 71, 585–599.
- Wu, J.-C.; Lai, C.-S.; Lee, P.-S.; Ho, C.-T.; Liou, W.-S.; Wang, Y.-J.; Pan, M.-H. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications. *Curr. Opin. Food Sci.* 2016, 8, 1–7.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81 (Suppl. S1), 230S–242S.
- Kris-Etherton, P.M.; Hecker, K.D.; Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.* 2002, 113, 71S–88S.
- Konczak, I.; Zhang, W. Anthocyanins—More Than Nature’s Colours. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, 5, 239–240.
- Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35:341-71.

- Dai, J.; Mumper, J.R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties *Molecules* 2010, 15, 7313–7352.
- Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.-T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary Polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 381–406.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 287–306.
- Jiang, Y.-L.; Liu, Z.-P. Natural Products as Anti-Invasive and Anti-Metastatic Agents. *Curr. Med. Chem.* 2011 18, 808–829.
- Seyed, M.A.; Jantan, I.; Bukhari, S.N.A.; Vijayaraghavan, K. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 725–737.
- Siddiqui, I.A.; Sanna, V.; Ahmad, N.; Sechi, M.; Mukhtar, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015, 1348, 20–31.
- Bhat, K.P.L.; Pezzuto, J.M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 957, 210–229.
- Stivala, L.A.; Savio, M.; Carafoli, F.; Perucca, P.; Bianchi, L.; Maga, G.; Forti, L.; Pagnoni, U.M.; Albini, A.; Prosperi, E.; et al. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 22586–22594.
- Lall, R.K.; Syed, D.N.; Adhami, V.M.; Khan, M.I.; Mukhtar, H. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 3350–3376.
- Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clin. Chem.* 2000, 46, 976–988.
- Okuda, T.; Ito, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules* 2011, 16, 2191–2217.
- Herrmann H. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988;186:1-5.
- Porter LW. Tannins. In: Harborne JB, ed. *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. London Academic Press, 1989;389-419.
- Peleg H, Naim M, Rouseff RL, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 1991 ;57:417-26.
- Kuhnau J (1976) The flavonoids. A class of semi- essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition & Dietetics* 24, 1117- 1191.
- Ho C-T, Lee CY, Huang M-T. Phenolic compounds in food and their effects on health, I: analysis, occurrence and chemistry. ACS Symposium Series 506. Washington, DC: American Chemical Society, 1992.
- Shahidi F, Naczk M. *Food phenolics: sources, chemistry effects, applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co, 1995.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992;40:2379-83.

- Bakker J, Preston NW, Timberlake CF. The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am J Enol Vitic* 1986; 37:121-6.
- Duthie GG & Crozier A (2000) Plant- derived phenolic antioxidants. *Current Opinions in Lipidology* 11, 43- 47.
- Vertommen J, Vandenenden M, Simoens L & Deleeuw I (1994) Flavonoid treatment reduces glycation and lipid peroxidation in experimental diabetic rats. *Phytotherapy Research* 8, 430- 432.
- Yoshina K, Tomita I, Sano M, Oguni I, Jara Y & Nakano M (1994) Effects of long term dietary supplementation of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Age* 17, 79- 85.
- Fremont L, Gozzelino MT, Franchi MP & Linard A (1998) Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *Journal of Nutrition* 128, 1495-1502.
- Roig P, Cascon E, Arola L, Blade C & Salvado MJ (1999) Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation *in vivo*. *Life Sciences* 6, 1517- 1524.
- Na, H. K.; Surh, Y. J., 2008: Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chemistry and Toxicology* 46, 1271–1278.
- Chuang, C. C.; McIntosh, M. K., 2011: Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual Review of Nutrition* 31, 155–176.
- OIV. (2012a). International Code of Oenological Practices. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, n. 1.
- Baiano, A., Conte, A., Contò, F., and Del Nobile, M. A. (2013). Recent patents in wine industry. *Recent Patents on Engineering* 7:25-40.
- Κουράκου-Δραγώνα, Σ. (1998}, Θέματα Οινολογίας, Τροχαλία, Αθήνα.
- Jackson, R.S. (2008), *Wine Science, Principles and Applications*, 3d Edition, Academic Press, San Diego, California.
- Ribereau - Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006], *Handbook of Enology, 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 4360–4367.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Tech*. 2006.
- Alonso, A., Guilleán, D., Barroso, C., Puertas, B. & Garcia, A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50, 5832– 5836.
- Negro, C., Tommasi, L. & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87, 41–44.
- Gonzalez-Paramas, A., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S. & Rivas-Gonzalo, J. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 234–238.



- Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z. et al. (2001). Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technology*, 76, 39–44.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*. 2007;173(3):502-511.
- I. Kafantaris, B. Kotsampasi, V. Christodoulou, E. Kokka, P. Kouka, Z. Terzopoulou, K. Gerasopoulos, D. Stagos, C. Mitsagga, I. Giavasis, S. Makri, K. Petrotos, D. Kouretas, Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (2016).
- Efthalia Kerasioti, Zoi Terzopoulou, Ourania Komini, Ioannis Kafantaris, Sotiria Makri, Dimitrios Stagos, Konstantinos Gerasopoulos, Nikita Y. Anisimov, Aristides M. Tsatsakis, Demetrios Kouretas: Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep, *Toxicology Reports* 4 (2017) 364–372.
- N. Goutzourelas, D. Stagos, A. Housmekeridou, C. Karapoulou, E. Kerasioti, N. Aligiannis, A. L. Skaltounis, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis, D. Kouretas: Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells, *International Journal Of Molecular Medicine* 36: 433- 441, 2015.
- Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T, Petrotos K, Gerasopoulos K, Mpesios A, Goutzourelas N, Kokkas S, Goulas P, Komiotis D, Kouretas D., Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food Chem Toxicol.* 2017 Apr;102:24-31.
- Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):53-67.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
- Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984; 105:457- 464.
- E. Frankel, A. Bakhouché, J. Lozano-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández- Gutiérrez, Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 5179–5188.
- D.K. Gessner, R. Ringseis, K. Eder, Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (2016).
- S. Dermeche, M. Nadour, C. Larroche, F. Moulti-Mati, P. Michaud, Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies, *Process Biochem.* 48 (2013) 1532–1552.
- A. Apostolou, D. Stagos, E. Galitsiou, A. Spyrou, S. Haroutounian, N. Portesis, I. Trizoglou, A.W. Hayes, A.M. Tsatsakis, D. Kouretas, Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts, *Food Chem. Toxicol.* 61 (2013) 60–68.

- Y. Xu, S. Burton, C. Kim, E. Sismour, Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties, *Food Sci. Nutr.* 4 (2016) 125–133.
- S.S. Singhal, S.P. Singh, P. Singhal, et al., Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal: a key molecule in stress-mediated signaling, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289 (2015) 361–370.
- P. Maher, The effects of stress and aging on glutathione metabolism, *Ageing Res. Rev.* 4 (2005) 288–314.
- Kerasioti E, Stagos D, Tsatsakis AM, Spandidos DA, Taitzoglou I, Kouretas D., Effects of sheep/goat whey protein dietary supplementation on the redox status of rats. *Mol Med Rep.* 2018 Apr;17(4):5774-5781.
- A. Carliz, D. Touati, Isolation of superoxide dismutase mutants in *E. coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* 5 (1986) 623–630.
- I. Fridovich, Superoxide dismutases, *Adv. Enzymol.* 58 (1986) 61–97.
- M. Pinelo, V.F. Laurie, A.L. Waterhouse, A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2839–2844.
- E. Frankel, A. Bakhouch, J. Lozano-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 5179–5188.
- V.E. Steele, G.J. Kelloff, D. Balentine, C.W. Boone, R. Mehta, D. Bagheri, C.C. Sigman, S. Zhu, S. Sharma, Comparative chemoprotective mechanisms of green tea: black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays, *Carcinogenesis* 21 (2000) 63–67.
- Chan JK, Charrier JG, Kodani SD, Vogel CF, Kado SY, Anderson DS, Anastasio C, Van Winkle LS., Combustion-derived flame generated ultrafine soot generates reactive oxygen species and activates Nrf2 antioxidants differently in neonatal and adult rat lungs. *Part Fibre Toxicol.* 2013 Aug 1;10:34.