



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
ΚΡΑΣΙΟΥ**

ΚΥΡΙΑΖΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
ΚΡΑΣΙΟΥ**

ΚΥΡΙΑΖΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

1

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων)

Αριστείδης Βεσκούκης, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή άσκηση διεξήχθη 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 ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Κουρέτα για την ευκαιρία διεξαγωγής της πτυχιακή μου εργασίας στο εργαστήριο του, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Κουρέτα Δημήτριο, Στάγκο Δημήτριο και Βεσκούκη Αριστείδα που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστήσω θερμά τον Φώτη Τέκο για την πίστη του σε έμένα, εμπιστεύοντας μου ένα μεγάλο μέρος της διδακτορικής του διατριβής. Οι γνώσεις, οι κατευθυντήριες γραμμές, οι συμβουλές, η στήριξη και η βοήθεια που μου πρόσφερε ήταν πολύτιμα για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου άσκησης, την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα άτομα της ομάδας του εργαστηρίου, τα οποία στήριξαν την προσπάθεια μου, δίνοντας μου συμβουλές και προσφέροντας απλόχερα βοήθεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου που είναι πάντα δίπλα μου στηρίζοντας τις αποφάσεις μου και έχοντας πίστη σε εμένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρασί αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα αλκοολούχα ποτά, με πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Η βιομηχανία του κρασιού λαμβάνει χώρα σε παγκόσμια κλίμακα, με κυριότερο παραγωγό, καταναλωτή κι έμπορο την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ωστόσο διάφορες σύγχρονες προκλήσεις τείνουν να απειλούν την οικονομία της οινοποιίας, όπως για παράδειγμα η συνεχώς μεταβαλλόμενη κατανάλωση οίνου, οι γεωπολιτικές εντάσεις, οι κλιματικές αλλαγές, η παγκόσμια πανδημία covid-19, η αυξανόμενη αγορά, οι πιστοποιήσεις που ενισχύουν τον ανταγωνισμό κτλ. Οι προκλήσεις αυτές σε συνδυασμό με την πιθανή αντιοξειδωτική/ευεργετική για την υγεία δράση που μπορεί να έχει το κρασί, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, θέτουν ως στόχο της παρούσας πτυχιακής άσκησης, την εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα και ιστούς αρσενικών επιμύων έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος ξινόμαυρου κρασιού.

Το εκχύλισμα ξινόμαυρου κρασιού φαίνεται να επηρεάζει την οξειδοαναγωγική ομοιότητα σε πολλούς ιστούς, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Συγκεκριμένα ενισχύει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με το σύστημα της γλουταθειόνης ενώ καταστέλλει μερικούς άλλους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση της αύξησης των επιπέδων της GSH σε μερικούς ιστούς και την παράλληλη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε μερικούς άλλους. Στο σύστημα της γλουταθειόνης ανήκουν επίσης τα ένζυμα GPx, GR και SOD, των οποίων όμως η συγκεντρώσεις φάνηκαν να μην επηρεάζονται σημαντικά. Εξάιρεση σε αυτό αποτελεί η SOD η οποία μειώθηκε στον σπλήνα, στο λεπτό έντερο και στους όρχεις, η GPx η οποία αυξήθηκε στο αίμα και η GR η οποία μειώθηκε στον εγκέφαλο της ομάδας χορήγησης. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά δεν αποκλείεται το γεγονός ενίσχυσης της λειτουργικότητας των εξεταζόμενων ενζύμων μέσω διαφόρων μηχανισμών ανεξάρτητων της συγκέντρωσης της GSH.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό εύρημα της πτυχιακής αυτής άσκησης ήταν η αρνητική επίδραση του εκχυλίσματος κρασιού, ιδιαίτερα σε ιστούς με αυξημένη λιπιδική σύσταση ή ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες, μέσω αύξησης της λιπδικής υπεροξειδωσης. Οι ιστοί αυτοί ήταν ο εγκέφαλος, ο σπλήνας, τα νεφρά και το λεπτό έντερο όπου βρέθηκαν αυξημένα τόσο τα επίπεδα των TBARS όσο και της GSH, συσχετίζοντας τους δύο αυτούς δείκτες μεταξύ τους. Παράδοξο αποτέλεσε η εύρεση της ανεξάρτητης δράσης του εκχυλίσματος κρασιού στην καρδιά και η ισχυρή δράση του στο αίμα, γνωρίζοντας ότι " Ένα ποτήρι κρασί την ημέρα κάνει καλό στην καρδιά". Τελικά η κατανάλωση κρασιού δεν κάνει καλό στην καρδιά αλλά στο αίμα, όσον αφορά το οξειδοαναγωγικό σύστημα.

Η κατανόηση των μηχανισμών δράσης του κρασιού λαμβάνοντας υπόψη διάφορες παραμέτρους πχ σύσταση, δοσολογία κτλ θεωρείται επιτακτική ανάγκη για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που απειλούν σήμερα την οινοποιία.

ABSTRACT

Wine is one of the most popular alcoholic beverages, with multiple health benefits. The wine industry takes place on a global scale, with the European Union being the main producer, consumer and trader. However, various modern challenges tend to threaten the economy of the winery, such as the shifting wine consumption, geopolitical tensions, climate changes, the covid-19 global pandemic, the growing market, certifications that enhance competition, etc. These challenges, combined with the potential antioxidant / health benefit that wine may have due to its high polyphenol content, set as an aim of this dissertation to evaluate indicators of redox status in the blood and tissues of male rats, after the administration of Xinomavro wine.

The extract of Xinomavro wine seems to affect redox homeostasis in many tissues, through various mechanisms. In particular, it enhances the antioxidant mechanisms associated with the glutathione system while suppressing some others. This was confirmed by the observation of an increase in GSH levels in some tissues and a parallel decrease in total antioxidant capacity in some others. The glutathione system also includes the enzymes GPx, GR and SOD, the concentration of which did not appear to be significantly affected. Exceptions are SOD which decreased in the spleen, small intestine and testes, GPx which decreased in the blood and GR which decreased in the brain of the administration group. Based on these results, the possibility of enhancing the functionality of the examined enzymes through various mechanisms independent of GSH concentration is not excluded.

Another characteristic finding of this dissertation was the negative effect of the wine extract, especially on tissues with increased lipid composition or sensitivity to oxidative stress, by increasing lipid peroxidation. These tissues were the brain, spleen, kidneys and small intestine where both TBARS and GSH levels were found to be elevated, correlating these two markers. It was paradoxical to find the independent action of the wine extract on the heart and its strong action on the blood, knowing that "A glass of wine a day is good for the heart". In the end, the consumption of wine is not good for the heart but for the blood, in terms of the redox system.

Understanding the mechanisms of action of wine taking into account various parameters such as composition, dosage, etc. is considered an urgent need to address the challenges that are currently threatening winemaking.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Το αμπέλι
- 1.2 Σύσταση κρασιού
- 1.3 Ιδιότητες κρασιού
- 1.4 Ιστορική αναδρομή
- 1.5 Παγκόσμιος χάρτης
- 1.6 Ονοματολογία και ταξινόμηση
- 1.7 Στάδια παρασκευής
- 1.8 Ελεύθερες ρίζες
 - 1.8.1 Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια
 - 1.8.2 Παραγωγή ROS μέσω φαγοκύτωσης
 - 1.8.3 Παραγωγή ROS από την οξειδάση της ξανθίνης
- 1.9 Οξειδωτικό στρες
 - 1.9.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε πρωτεΐνες
 - 1.9.2 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε νουκλεϊκά οξέα
 - 1.9.3 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε λιπίδια
- 1.10 Αντιοξειδωτικά
 - 1.10.1 Ενζυμικά αντιοξειωτικά
 - 1.10.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά
- 1.11 Δείκτες οξειδωτικού στρες και πειραματικά στάδια

2. ΣΚΟΠΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός
 - 3.1.1 Ζώα και συνθήκες διαβίωσης
 - 3.1.2 Εκχύλισμα και προετοιμασία δόσης
 - 3.1.3 Χορήγηση προβλεπόμενης δόσης
 - 3.1.4 Κλινική εξέταση
 - 3.1.5 Νευρολογική εξέταση
 - 3.1.6 Νεκροτομή
 - 3.1.7 Στατιστική
- 3.2 Πειραματικά Πρωτόκολλα
 - 3.2.1 Διαχωρισμός ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (RBCL) και πλάσματος
 - 3.2.2 Υπολογισμός αιμοσφαιρίνης
 - 3.2.3 Επεξεργασία ιστών
 - 3.2.4 Υπολογισμός της συνολικής πρωτεΐνης σε ιστούς με τη μέθοδο Bradford
 - 3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης
 - 3.2.6 Υπολογισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)
 - 3.2.7 Προσδιορισμός των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)
 - 3.2.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

- 3.2.9 Προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης (CAT)
- 3.2.10 Προσδιορισμός της δραστικότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)
- 3.2.11 Προσδιορισμός της δραστικότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)
- 3.2.12 Προσδιορισμός της δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 4.1 Συγκέντρωση γλουταθειόνης
- 4.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)
- 4.3 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)
- 4.4 Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων
- 4.5 Δραστικότητα καταλάσης (CAT)
- 4.6 Δραστικότητα σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)
- 4.7 Δραστικότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)
- 4.8 Δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: *Vitis vinifera*

ΣΧΗΜΑ 2: Ανατομία ράγας σταφυλιού

ΣΧΗΜΑ 3: Ταξινόμηση με βάση τον ΑΟC

ΣΧΗΜΑ 4: Στάδια παρασκευής ερυθρού και λευκού οίνου

ΣΧΗΜΑ 5: Τρόπος δράσης ελευθέρων ριζών

ΣΧΗΜΑ 6: Πηγές ελευθέρων ριζών

ΣΧΗΜΑ 7: Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια

ΣΧΗΜΑ 8: Παραγωγή ROS μέσω φαγοκύτωσης

ΣΧΗΜΑ 9: Μη ενζυμική οδός λιπιδικής υπεροξειδωσης

ΣΧΗΜΑ 10: Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης

ΣΧΗΜΑ 11: Εξουδετέρωση O_2^- μέσω δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 1: Αλκοολική ζύμωση

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 2: Αναγωγή μοριακού οξυγόνου στα μιτοχόνδρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 3: Παραγωγή ROS από την οξειδάση της ζανθίνης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 4: Στάδια σύνθεσης της γλουταθειόνης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 5: Οξείδωση ασκορβικού οξέος

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 6: Αναγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 7: Διάσπαση H_2O_2 από το ένζυμο καταλάση

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 8: Σχηματισμός H_2O_2 από το ένζυμο σουπεροξειδική δισμουτάση

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 9: Οξείδωση ανηγμένης γλουταθειόνης από το ένζυμο περοξειδάση της γλουταθειόνης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 10: Αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης από το ένζυμο περοξειδάση της γλουταθειόνης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 11: Αντίδραση ανηγμένης γλουταθειόνης με το 2-νιτροβενζοϊκό οξύ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Σύσταση κρασιού

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Κύριες χώρες παραγωγής οίνου το 2020

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Κύριες χώρες κατανάλωσης οίνου το 2020

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Πρωτογενή και δευτερογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: Συγκέντρωση γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ιστών και αίματος των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με το TBA σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: Δραστηριότητα ενζύμου καταλάσης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Δραστικότητα ενζύμου σουπεροξειδικής δισμουτάσης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (*untreated*) και χορήγησης (*wine extract*)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: Δραστικότητα ενζύμου περοξειδάση της γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (*untreated*) και χορήγησης (*wine extract*)

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12: Δραστικότητα ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (*untreated*) και χορήγησης (*wine extract*)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Υπομορφές οξειδωτικού στρες

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Δείκτες οξειδωτικού στρες

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΧΑΡΤΩΝ

ΧΑΡΤΗΣ 1: Παγκόσμιος χάρτης παραγωγής κρασιού

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κρασί (ή οίνος) είναι ένα αλκοολούχο ποτό το οποίο συνήθως παράγεται μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης σταφυλιών. Κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης οι ζυμομήκυτες, γνωστοί κι ως ζύμη ή μαγιά, παράγουν συγκεκριμένα ένζυμα που καταναλώνουν τα σάκχαρα (πχ γλυκόζη) από τα σταφύλια και τη μετατρέπουν σε αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, με ταυτόχρονη απελευθέρωση θερμότητας.



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 1: *Αλκοολική ζύμωση*

Τεχνικά, όλα τα φρούτα μπορούν να παράξουν κρασί, όμως το πλέον συνηθισμένο και ποιοτικό είναι αυτό που φτιάχνεται από σταφύλια. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή του κρασιού απαιτείται μία ή περισσότερες ποικιλίες του ευρωπαϊκού είδους σταφυλιού *Vitis vinifera*, όπως *Pinot noir*, *Chardonnay*, *Cabernet Sauvignon*, *Gamay* και *Merlot*. Οι διαφορετικές ποικιλίες κρασιών προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών ή/και διαφορετικά στελέχη ζύμης.



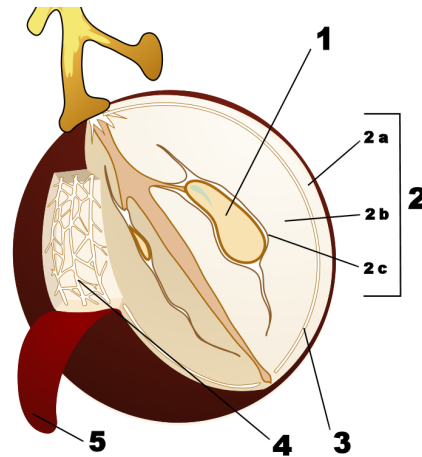
ΣΧΗΜΑ 1: *Vitis vinifera* [1]

1.1 Το αμπέλι

Το αμπέλι ή αλλιώς το κλίμα (*Vitis vinifera*) είναι ένα πολυετές, αγγειόσπερμο φυτό το οποίο ανήκει στην τάξη των *Vitales* και στην οικογένεια των *Vitaceae*. Η οικογένεια *Vitaceae* αποτελείται από 16 γένη και 770 είδη. Μόνο όμως το γένος *Vitis* χρησιμοποιείται στην παραγωγή κρασιού. Το αμπέλι είναι αναρρηχτικό φυτό με τροποποιημένα κλαδιά όπου μπορεί να φτάσει τα 17 μέτρα (56 πόδια) σε μήκος ή και περισσότερο. Σε άνυδρες περιοχές μπορεί να σχηματίσει έναν σχεδόν όρθιο θάμνο.

Το σταφύλι είναι ο καρπός ή αλλιώς το βοτανικό μούρο του αμπελιού το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή κρασιού. Επιπλέον καταναλώνεται όπως έχει και χρησιμοποιείται για την παρασκευή μαρμελάδων, γλυκών, σταφίδων, οινοπνευματωδών ποτών (πχ τσίπουρο, κουμανταρία) κτλ. Η ανάπτυξη του γίνεται σε συστάδες των 15 έως 300, έχει σφαιρικό σχήμα και χρώμα βυσσινί, μαύρο, σκούρο μπλε, κίτρινο, πράσινο, πορτοκαλί ή ροζ. Το σταφύλι αποτελείται από τους βόστρυχους και τις ράγες. Οι βόστρυχοι ή αλλιώς κοτσάνια είναι υπεύθυνα για την μεταφορά των θρεπτικών

ουσιών στους καρπούς και την στήριξη των ράγων. Οι ράγες είναι σαρκώδεις, απλοί καρποί, αδιάρρηκτοι, μη διανοιγόμενοι, δηλαδή προκειμένου να ελευθερώσουν τα σπέρματα τους δεν διαρρηγνύονται αλλά πέφτουν ολόκληρα κάτω στη γη αφού ωριμάσουν. Αποτελούνται από το φλοιό (10 -20% κ.β), το περικάρπιο ή σάρκα (74 - 87%) και τα κουκούτσια (3 -6%). Ο φλοιός περιβάλλει εξωτερικά τον καρπό και αποτελείται από τρία στρώματα: την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα. Το περικάρπιο περιβάλλει τους σπόρους και αποτελείται από ένα λεπτό, υμενώδες εξώκαρπιο, ένα παχύ, σαρκώδες μεσοκάρπιο κι ένα λεπτό ενδοκάρπιο. Τα κουκούτσια είναι τα σπέρματα του αμπελιού και εντοπίζονται στο ενδοκάρπιο.



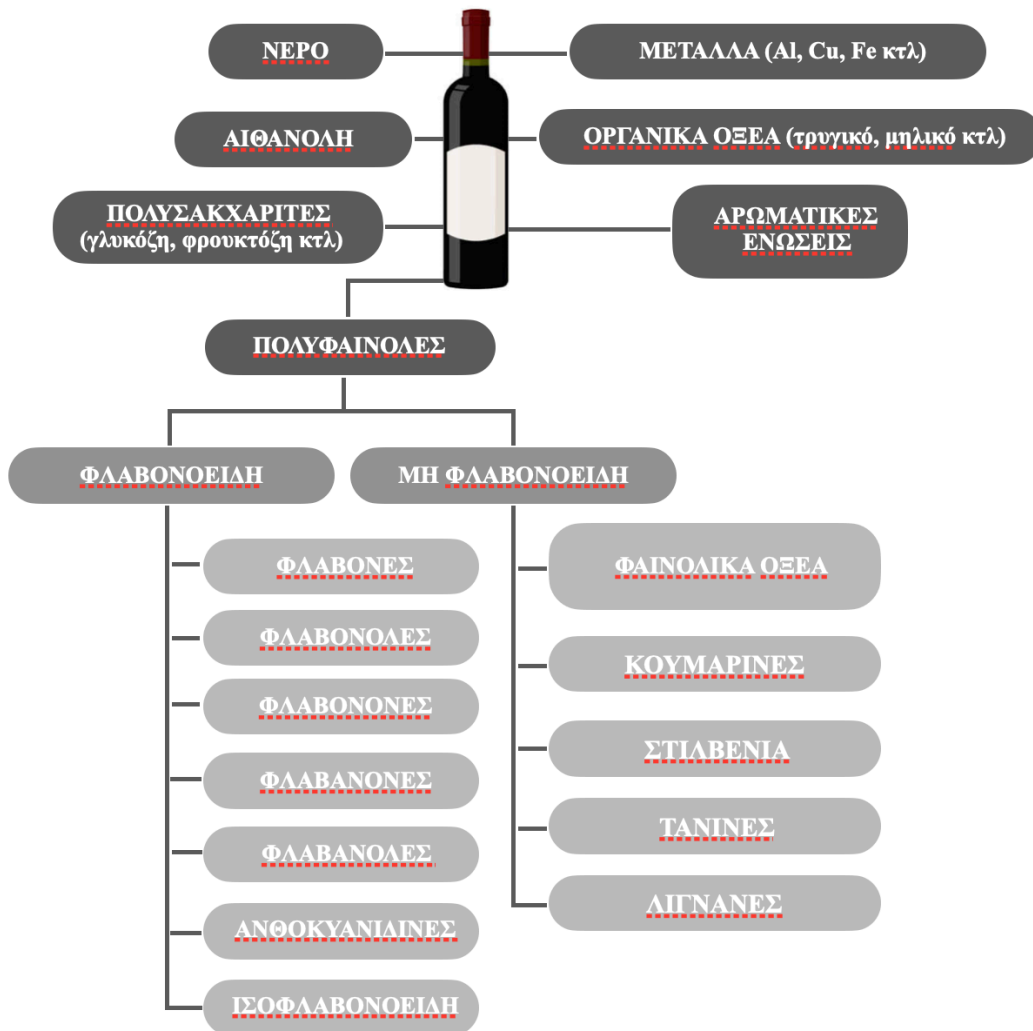
ΣΧΗΜΑ 2: Ανατομία ράγας σταφυλιού: 1. Κουκούτσι 2.Περικάρπιο [2a.Εξώκαρπιο 2b.Μεσοκάρπιο 2c.Ενδοκάρπιο] 3.4.Αγγειώδεις δεσμίδες 5. Φλοιός [2]

Κάθε τμήμα της ράγας συνεισφέρει διαφορετικά στην οινοποίηση εξαιτίας της διαφορετικής της σύστασης. Για παράδειγμα στον φλοιό εντοπίζονται χρωστικές ουσίες, οι οποίες προσδίδουν το χρώμα των κρασιών και ταννίνες, υπεύθυνες για τα γευστικά χαρακτηριστικά του κρασιού και την αντοχή στο χρόνο. Στα κουκούτσια εντοπίζονται ταννίνες, φαινολικές ενώσεις, ελαιώδεις και γλυκεροφοσφορικές ουσίες οι οποίες προσδίδουν αρνητική χαρακτηριστική οσμή στο κρασί. Ενώ η σάρκα αποτελεί το τμήμα της ράγας που περιέχει σχεδόν αποκλειστικά τον χυμό του σταφυλιού. [3]

1.2 Σύσταση κρασιού

Το κρασί αποτελείται από νερό, αιθανόλη, γλυκερίνη, πολυσακχαρίτες, μέταλλα, οργανικά οξέα, πολυφαινολικές κι αρωματικές ενώσεις. [4,5] Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι το σύνολο των φυσικών ενώσεων των οποίων ο ανθρακικός σκελετός περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (OH) συνδεδεμένα(-ους) με άλλους υποκατάστατες. Διακρίνονται σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή. [6] Τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν πάνω από το 85% των φαινολικών συστατικών στο κόκκινο κρασί και περιλαμβάνουν τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ισοφλαβονοειδή και ανθοκυανιδίνες. Οι φλαβονόλες, όπως η κερσετίνη, η μυρικετίνη και η καμπφερόλη αποτελούν πλειοψηφία των φλαβονοειδών που εντοπίζονται στο κρασί. Τα μη φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια, ταννίνες, τις κουμαρίνες και τις λιγνάνες. [5,6,7,8]

Συγκεκριμένα οι τανίνες συμβάλλουν στη γεύση των κρασιών, ενώ σε συνεργασία με τις ανθοκυανίνες σχηματίζουν χρωματισμένα πολυμερή τα οποία παρέχουν σταθερές χρωστικές υπεύθυνες για την ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος του κρασιού. [9]



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Σύσταση κρασιού

Η παρουσία των πολυφαινολικών ενώσεων στο κρασί είναι υψηλής σημασίας εξαιτίας της ικανότητας τους να δρουν ως προοξειδωτικά, αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά. Η αντιοξειδωτική τους δράση μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Έμμεσα μέσω επαγωγής δράσης, έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων ή κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών και άμεσα μέσω αναγωγής των ελευθέρων ριζών και καταστολής της δράσης τους. [9,10,15] Η συγκέντρωση και η σύνθεση των πολυφαινολών εξαρτάται από

πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία του σταφυλιού, το κλίμα, το έδαφος και τις πρακτικές οινοποίησης με αποτέλεσμα να αλλάζει και το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή το χρώμα, η γεύση και η υφή του κρασιού. [6,7,10,11,12] Σήμερα είναι γνωστό ότι το κόκκινο κρασί περιέχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυφαινολικών ενώσεων της τάξης των χιλιάδων mg GAE.L⁻¹ ενώ το λευκό κρασί της τάξης των εκατό mg GAE.L⁻¹. [4]

Σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του κρασιού διαδραματίζουν τα μέταλλα. Συγκεκριμένα συμμετέχουν στην παραγωγή και στην παλαίωση του κρασιού, την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, την προώθηση διεργασιών οξειδοαναγωγής κατά την ωρίμανση και τελικά την επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού. Για παράδειγμα, το αλουμίνιο (Al), ο χαλκός (Cu), ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), το νικέλιο (Ni) κι ο ψευδάργυρος (Zn), συμβάλλουν στη θολερότητα, στην ανεπιθύμητη γεύση και το άρωμα. Τα μέταλλα προέρχονται από δύο κύριες πηγές. Η πρώτη, φυσική πηγή είναι το έδαφος στο οποίο καλλιεργείται το αμπέλι. Τα μέταλλα εισέρχονται από τις ρίζες και παρέχουν το μεγαλύτερο μέρος των ιόντων που εντοπίζονται στο κρασί. Η δεύτερη πηγή προέρχεται από την ανθρώπινη παρέμβαση, για παράδειγμα, μέσω καλλιεργητικών πρακτικών (πχ λίπανση), πρακτικών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (πχ χρήση πρόσθετων, διαφορετικών μηχανημάτων κτλ), μόλυνσης του περιβάλλοντος και χρήση απαγορευμένων χημικών ουσιών. [13]

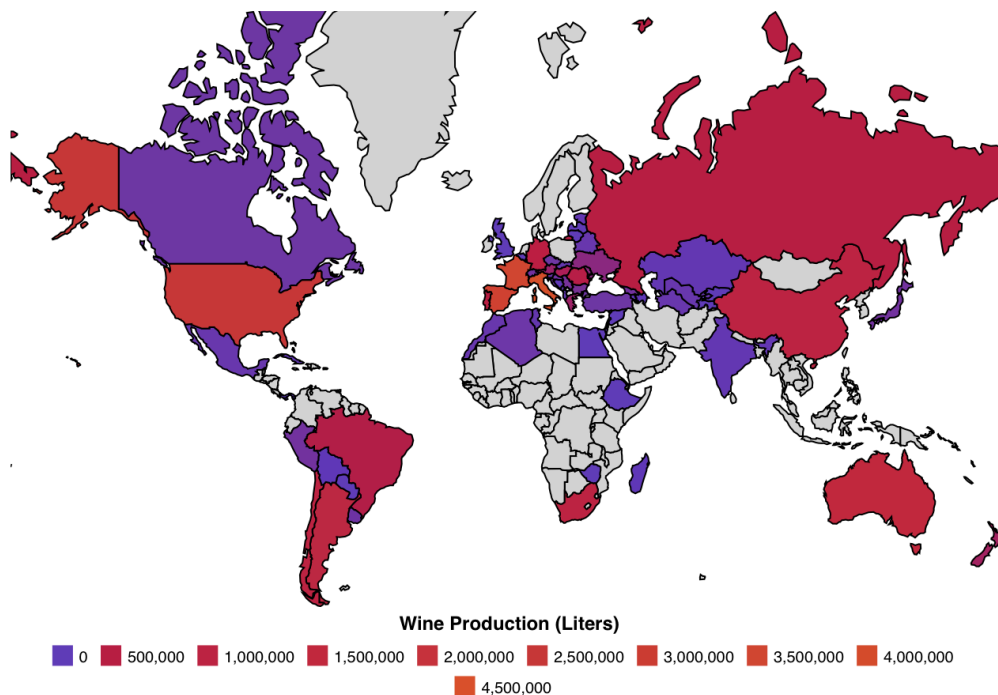
1.3 Ιδιότητες κρασιού

Οι ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού οφείλονται κυρίως στο μη αλκοολούχο τμήμα του, το οποίο περιέχει μια μεγάλη ποικιλία φαινολικών ενώσεων. Αρχικά, σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων πχ. υπέρταση, μέσω μείωσης της αρτηριακής πίεσης, υπερτροφία, στεφανιαία νόσο και αρτηριοσκλήρωση μέσω ρύθμισης των επιπέδων LDL, HDL και εναπόθεσης λίπους. [12,14,15] Επίσης έχει βρεθεί ότι το κόκκινο κρασί δρα ευεργετικά σε μεμονωμένα ανθρώπινα όργανα μειώνοντας το ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του οισοφάγου, γαστρικού καρκίνου, συνδρόμου Barrett (Barrett's esophagus) κτλ. Επιπλέον συμβάλλει στη μείωση της ινσουλίνης του πλάσματος σε διαβητικά άτομα και ελαττώνει τις πιθανότητες εμφάνισης του διαβήτη μέσω μείωσης των επιπέδων γλυκόζης.

Σημαντική επίσης αποτελεί και η αντιφλεγμονώδης, αντιθρομβωτική δράση του κρασιού καθώς και η συμβολή του στην καλή στοματική υγιεινή εξαιτίας της αντιμικροβιακής δράσης έναντι συγκεκριμένων βακτηρίων. [5,16] Το ασκορβικό οξύ, το διοξειδίο του θείου και μια πλοιοψηφία πολυφαινολικών ενώσεων, που περιέχονται στο κρασί, παρουσιάζουν νευροπροστατευτικό και αντιοξειδωτικό ρόλο μέσω αναστολής της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC alpha), της NADPH οξειδάσης, της οξειδάσης της ξανθίνης, ενεργοποίησης της SIRT1 πρωτεΐνης, και αναστολής διαφόρων άλλων μονοπατιών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. [5,9]

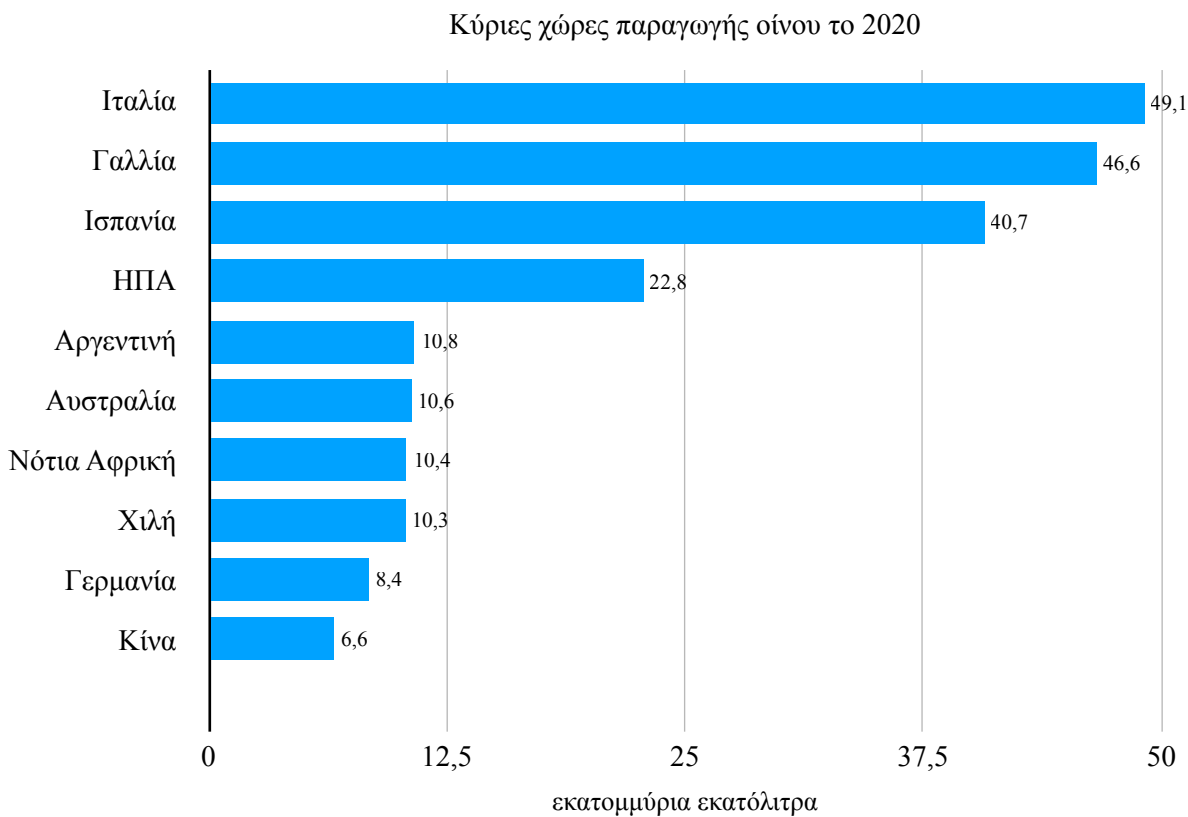
1.4 Ιστορική αναδρομή:

Η ιστορία του κρασιού ξεκινά με την συνάντηση του ανθρώπου με το φυτό *Vitis vinifera sylvestris* κατά την έξοδο από την Αφρική στην περιοχή του Λιβάνου περίπου 60.000 - 100.000 χρόνια πριν, κατά τη διάρκεια της Παλαιολιθικής εποχής (MacNeil, 2015). Οι μέθοδοι οινοποίησης και αποθήκευσης κρασιού εφευρέθηκαν αργότερα στη Νεολιθική περίοδο γύρω στο 8500 - 4000 π.Χ. (Cavaliere et al., 2003). Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από αρχαιολογικά ευρήματα οινοποίησης που βρέθηκαν στην Κίνα.



ΧΑΡΤΗΣ 1: Παγκόσμιος χάρτης παραγωγής κρασιού [18]

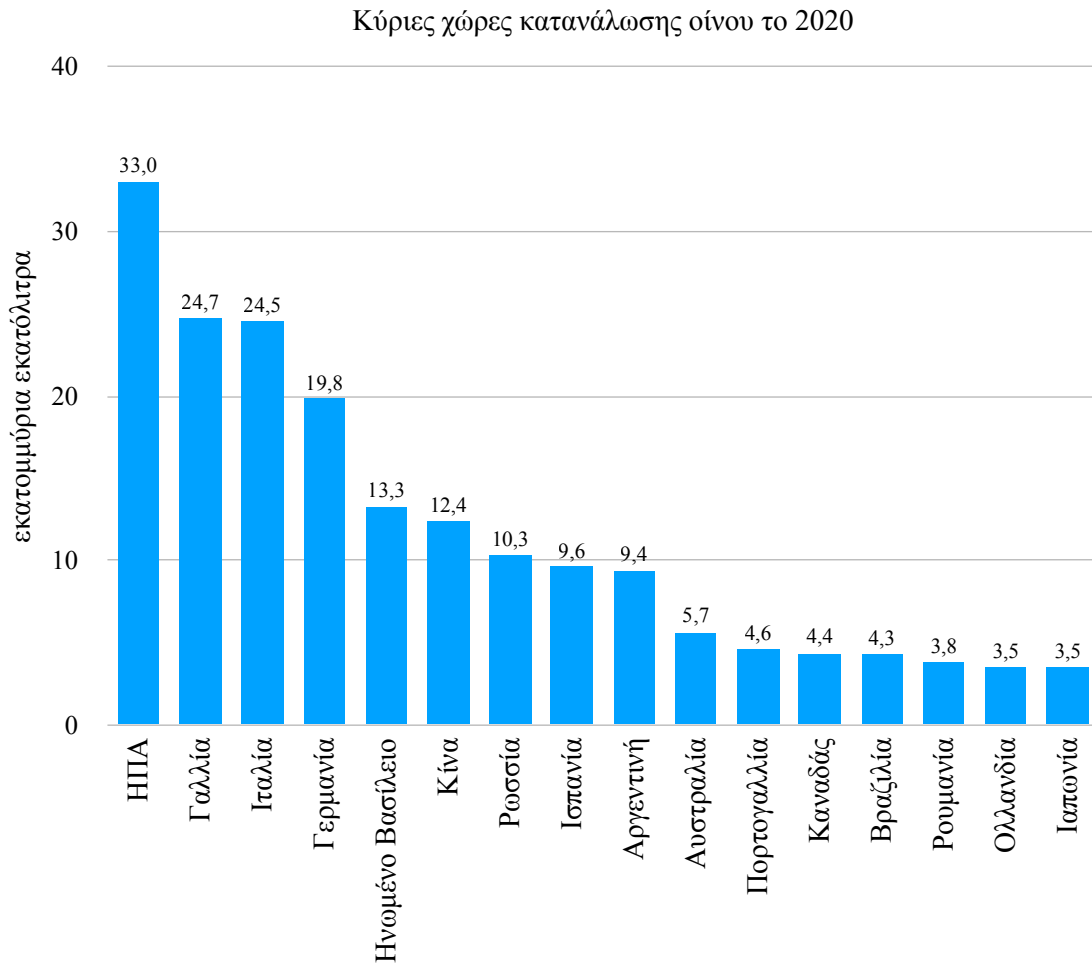
Συγκεκριμένα, το 2001 βρέθηκαν σπόροι σταφυλιού στο Jiahu της Κίνας και κεραμικά σκεύη με υπολείμματα οινοποίησης όπως τρυγικό οξύ και τρυγικό ασβέστιο, τα οποία χρονολογούνται περίπου από το 7000 π.Χ. Επίσης στην τοποθεσία Jiahu, βρέθηκαν διάφορα αγγεία και υλικά αγγείων, όπως πηλός, άνθρακας, κεραμικό κτλ, οικιακά αγγεία με επίπεδο ή αιχμηρό πυθμένα τα οποία χρησιμοποιούνταν ως δοχεία για τη ζύμωση κρασιού. Αρχαιολογικά ευρήματα βρέθηκαν επίσης στην Γεωργία τα οποία χρονολογούνται περίπου από το 6000 π.Χ ενώ το παλαιότερο οινοποιείο βρέθηκε να ιδρύθηκε στην Αρχαία Αρμενία το 4100 π.Χ.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Κύριες χώρες παραγωγής οίνου το 2020 [21]

Η ιστορία του κρασιού συνεχίζεται το 3100 π.Χ με τους Φαραώ να ανεβαίνουν στην εξουσία της Αιγύπτου και να αρχίζουν να φτιάχνουν μια ουσία από κόκκινα σταφύλια η οποία έμοιαζε με κρασί. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, οι Αιγύπτιοι έρχονται σε επαφή με Εβραίους καθώς και Φοίνικες. Έπειτα οι Φοίνικες αρχίζουν να καλλιεργούν σταφύλια και να παρασκευάζουν κρασί διαδίδοντας το σε όλο τον κόσμο. Το εμπόριο κρασιού στη Μεσόγειο χρονολογείται μεταξύ 1200 π.Χ — 539 π.Χ. Οι Έλληνες,

το 800 π.Χ υιοθετώντας το κρασί από τους Φοίνικες, ξεκινούν να τελειοποιούν το ρόφημα, με το κρασί πλέον να αποκτά συμβολικό χαρακτήρα για το εμπόριο, τη



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Κύριες χώρες κατανάλωσης οίνου το 2020 [21]

θρησκεία και την υγεία. Με την άνοδο της Ελλάδας στην εξουσία, τις κατακτήσεις και την αποίκηση σε νέα κράτη, το κρασί καταφέρνει να φτάσει στη Σικελία, στη νότια Ιταλία και τελικά στη Ρώμη. Καθώς η Ρωμαϊκή Αυτοκρατορία υιοθετεί την Καθολική Εκκλησία και τον Χριστιανισμό, το κρασί γίνεται κεντρικό μέρος των εκκλησιαστικών μυστηρίων. Η σημασία του κρασιού για τη θρησκεία παρακινεί την εκκλησία να επικεντρωθεί στην καλλιέργεια σταφυλιών και την παραγωγή κρασιού με αποτέλεσμα την τελειοποίηση της οινοποίησης. Το κρασί συνεχίζει να ταξιδεύει σε όλο τον κόσμο και τελικά να φτάνει στο Μεξικό, τη Βραζιλία, και όλη τη Νότια Αμερική, από τους κατακτητές, το 1492 — 1600 μ.Χ. [17]

1.5 Παγκόσμιος Χάρτης

Η βιομηχανία του κρασιού λαμβάνει χώρα σε παγκόσμια κλίμακα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση αποτελεί τον κυριότερο παραγωγό, έμπορο αλλά και καταναλωτή οίνου. Συγκεκριμένα αντιπροσωπεύει το 45% των αμπελουργικών ζωνών του πλανήτη, το 65% της παραγωγής, το 60 % της παγκόσμιας κατανάλωσης και το 70 % των εξαγωγών. [19]

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία που παρέχονται στην έκθεση της Διεθνούς Οργάνωσης Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organisation of the United Nations - FAO), η Ιταλία παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες κρασιού ετησίως (49,1 mhl) αφού διαθέτει κατάλληλο κλίμα για καλλιέργεια σταφυλιών. Όσον αφορά την κατανάλωση του κρασιού ανέρχεται περίπου στα 24,5 mhl ετησίως, αποδεικνύοντας έτσι τη δημοτικότητα του τοπικού αυτού προϊόντος. [20, 21]

Η Γαλλία κατέχει τη δεύτερη θέση στη λίστα χωρών παραγωγής κρασιού, με ετήσια παραγωγή 46,6 mhl. Μια μεγάλη ποικιλία κρασιών συναντάται εκεί με τα κρασιά υψηλής ποιότητας να εξάγονται σε άλλες χώρες ενώ τα κρασιά χαμηλότερης ποιότητας να καταναλώνονται τοπικά, σε ποσότητες των 24,7 mhl. Η Ισπανία βρίσκεται στην τρίτη θέση της λίστας των χωρών παραγωγής κρασιού, με 40,7 mhl ετησίως. Επίσης διαθέτει τις μεγαλύτερες εκτάσεις σοδιάς σταφυλιών και η κατανάλωση κρασιού φτάνει τα 9,6 mhl. [20, 21]

Η Ελλάδα εκτιμάται ότι παράγει περίπου 2,3 mhl ετησίως και καταναλώνει 241,8 εκατομμύρια λίτρα. Περιλαμβάνει λίγες μεγάλες βιομηχανίες κρασιού καθώς και περισσότερες μικρομεσαίες οινοποιητικές επιχειρήσεις, αγροτικούς συνεταιρισμούς και εισαγωγικές εταιρείες. Η παραγωγή του κρασιού στην Ελλάδα άρχισε να αναπτύσσεται μετά τη δεκαετία του 1960. Σύγχρονος μηχανολογικός εξοπλισμός αντικαθιστά τον παλιό, οινολόγοι μεταφέρουν τις γνώσεις τους για βελτίωση της ποιότητας του κρασιού και πραγματοποίηση φύτευσης εκλεκτών ποιοτικά ποικιλιών σταφυλιού λαμβάνει χώρα. Σημαντική επίσης ήταν και η στροφή του καταναλωτικού κοινού προς τα ελληνικά προϊόντα, κατά την περίοδο της κρίσης. [22]

Σήμερα, αυτή η κατάταξη αυτή των χωρών με βάση τις ποσότητες παραγωγής και κατανάλωσης κρασιού χαρακτηρίζεται από μεγάλη αστάθεια εξαιτίας των γεωπολιτικών εντάσεων, της αλλαγής του κλίματος και της πανδημίας του covid-19.

1.6 Ονοματολογία και ταξινόμηση

Για την ονοματολογία των κρασιών χρησιμοποιούνται δύο κυρίαρχα συστήματα. Το πρώτο σύστημα βασίζεται στη γεωγραφική προέλευση του κρασιού. Για παράδειγμα το Bordeaux αποτελείται από 2 ποικιλίες σταφυλιών, Cabernet Sauvignon και Merlot, και προέρχεται από την γαλλική πόλη "Bordeaux" απ' όπου πήρε και την ονομασία του. Μέσα στα πλαίσια του συστήματος αυτού έχουν δημιουργηθεί διάφορα άλλα υποσυστήματα. Ένα από αυτά αποτελεί το Appellation d'Origine Controlée (AOC) ή

Appellation d'Origine Protégée (AOP), το οποίο ιδρύθηκε από την Γαλλία αλλά υιοθετήθηκε από πολλές ευρωπαϊκές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα. Στον κατάλογο της AOC εντάσσονται κρασιά υψηλής ποιότητας τα οποία παράγονται σύμφωνα με αυστηρούς κανόνες που ρυθμίζουν τον τύπο κλαδέματος, τις



ΣΧΗΜΑ 3: Ταξινόμηση με βάση τον AOC [23]

αποδόσεις, τη διάρκεια ωρίμανσης, την τοποθεσία των αμπελιών κ.λπ. Εντός της AOC υπάρχουν διαφορετικές ταξινομήσεις: περιφερειακό (πχ. Bordeaux, Burgundy), υποπεριφερειακό (πχ Médoc στο Bordeaux), χωρικό (πχ Pauillac στο Médoc) και μερικές εξαιρέσεις (πχ. Grand Cru). [17,18] Ένα δεύτερο υποσύστημα ταξινόμησης με βάση τη γεωγραφική προέλευση διακρίνει τα κρασιά σε:

1. Οίνους με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π): παράγονται εντός των ορίων της προστατευόμενης περιοχής, από ποικιλίες σταφυλιών συνιστώμενες για την περιοχή. Η απόδοση των αμπελώνων δεν υπερβαίνει τα 1200 κιλά ανά στρέμμα.
2. Οίνους με προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη (Π.Γ.Ε): παράγονται εντός των ορίων της προστατευόμενης περιοχής, από διάφορες ποικιλίες σταφυλιών όχι γηγενών απαραίτητα για την περιοχή.

3. Οίνους χωρίς προστατευόμενη ονομασία προέλευσης: παράγονται σε οποιαδήποτε περιοχή, από διάφορες ποικιλίες σταφυλιών όχι γηγενών απαραίτητα για την περιοχή.

Το δεύτερο σύστημα στηρίζεται στην ποικιλία σταφυλιών που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του κρασιού. Για παράδειγμα το Riesling ονομάστηκε έτσι εξαιτίας της παραγωγής του από την ποικιλία σταφυλιών Riesling. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, προκειμένου ένα κρασί να χαρακτηριστεί ως μονοποικιλιακό, βασική προϋπόθεση είναι να αποτελείται τουλάχιστον 75% από ένα είδος σταφυλιού, ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση τουλάχιστον 85%. Στην περίπτωση που αναφέρονται δύο ή περισσότερες ποικιλίες, τότε ο συνδυασμός τους πρέπει να φτάνει το 100% και να αναγράφονται με φθίνουσα σειρά.

Τα κρασιά ταξινομούνται με βάση το χρώμα, τον χρόνο παλαίωσης, την γλυκύτητα και την περιεκτικότητά τους σε διοξείδιο του άνθρακα.

Το χρώμα του κρασιού καθορίζεται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, στα οποία περιέχονται οι χρωστικές και συμμετέχουν ή όχι στη διαδικασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, το **κόκκινο/ερυθρό κρασί** παράγεται από ποικιλίες κόκκινων ή μαύρων σταφυλιών με τα στερεά τους μέρη να συμμετέχουν στη ζύμωση. Ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες ερυθρών οίνων εντοπίζεται και το **ξινόμαυρο** το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα έντονο, βαθύ μαύρο χρώμα, υψηλή οξύτητα, πλούσιο σε τανίνες, φαινόλες και πολλαπλά αρώματα όπως ντομάτας, ελιάς, φρούτων του δάσους, δαμάσκηνα κτλ. Το κρασί αυτό καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στη Βόρεια Ελλάδα, κυρίως στην περιοχή της Μακεδονίας και η διαδικασία παλαίωσης του μπορεί να διαρκέσει πολλά χρόνια. Το **λευκό κρασί** μπορεί να παραχθεί από οποιαδήποτε ποικιλία σταφυλιού, με το χρώμα του να παραμένει λευκό, εφόσον τα στερεά μέρη των σταφυλιών διαχωρίζονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Το **ροζέ κρασί**, παράγεται όπως και το κόκκινο, με τη διαφορά ότι η παραμονή των στερεών μερών των σταφυλιών στη ζύμωση διαρκεί λιγότερο, συνήθως μερικές ώρες.

Η ταξινόμηση με βάση το χρόνο παλαίωσης του κρασιού αφορά το χρονικό διάστημα μεταξύ του τρύγου και της προώθησης για κατανάλωση. Με βάση το χρονικό αυτό διάστημα τα κρασιά ταξινομούνται σε 5 κατηγορίες:

1. **Πρώιμοι οίνοι:** είναι τα κρασιά τα οποία κυκλοφορούν στην αγορά σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον τρύγο και καταναλώνονται σε διάστημα λίγων μηνών.
2. **Φρέσκοι οίνοι:** είναι τα κρασιά τα οποία κυκλοφορούν στην αγορά σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον τρύγο και το χρονικό διάστημα κατανάλωσης τους είναι μεγαλύτερο.
3. **Παλαιωμένος οίνος:** είναι το κρασί το οποίο τοποθετείται και αφήνεται σε βαρέλια για μεγάλα χρονικά διαστήματα ώστε να γίνει η παλαίωση του.
4. **Επιτραπέζιος οίνος ή Κάβα (Cava):** είναι τα κρασιά των οποίων ο χρόνος παλαίωσης διαρκεί δύο και τρία χρόνια για τα λευκά και ερυθρά αντίστοιχα. Τα λευκά κρασιά τοποθετούνται σε βαρέλια τους πρώτους έξι μήνες και μεταφέρονται σε φιάλες τους υπόλοιπους δεκαοκτώ μήνες. Τα ερυθρά κρασιά παλαιώνονται τους πρώτους έξι μήνες σε καινούργια δρύινα βαρέλια μικρότερα των 600lt ή για ένα χρόνο σε παλιά βαρέλια και τουλάχιστον δύο χρόνια σε φιάλη.
5. **Επιλεγμένος (Reserve) και Ειδικά Επιλεγμένος (Grande Reserve) οίνος:** είναι τα κρασιά που παλαιώνονται, βελτιώνοντας έτσι σημαντικά την ποιότητα τους. Ο όρος «Reserve» αφορά τα λευκά κρασιά που παλαιώνονται για δύο χρόνια συνολικά, και τα ερυθρά κρασιά που παλαιώνονται για τρία χρόνια, εκ των οποίων τους έξι μήνες είναι σε βαρέλια και τους υπόλοιπους σε φιάλες. Ο όρος «Grande Reserve» αναφέρεται στα λευκά κρασιά που έχουν υποστεί παλαίωση τριών χρόνων, εκ των οποίων τον ένα χρόνο ήταν σε βαρέλια διαφόρων μεγεθών και τον ένα χρόνο σε φιάλες. Επίσης αφορά ερυθρά κρασιά που έχουν παλαιωθεί τέσσερα χρόνια, εκ των οποίων τα δύο χρόνια ήταν αποθηκευμένα σε βαρέλια μικρότερα των 600 λίτρων και τα υπόλοιπα σε φιάλες. Οι ενδείξεις Επιλεγμένος και Ειδικά Επιλεγμένος αναγράφονται μόνο σε οίνους με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (Π.Ο.Π).

Η γλυκύτητα των κρασιών μετριέται κατά τη διαδικασία της συγκομιδής και καθορίζεται από την ποσότητα ζάχαρης που παραμένει στο κρασί μετά από τη διαδικασία της ζύμωσης. Με βάση την περιεκτικότητα ζάχαρης τα κρασιά ταξινομούνται σε **ξηρά** (<4 g/L), **ημίξηρα** (4 - 12 g/L), **γλυκά** (>45 g/L) και **ημίγλυκα** (12 - 45 g/L).

Τελευταίο κριτήριο ταξινόμησης των κρασιών αποτελεί η περιεκτικότητα τους σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Το CO₂ παράγεται κατά τη διαδικασία της αλκοολικής

ζύμωσης και διατηρείται στο κρασί ενώ μπορεί να προστεθεί και εκ των υστέρων. Ανάλογα με την περιεκτικότητα τους σε αυτό, τα κρασιά διακρίνονται σε *αφρώδη, ημιαφρώδη, αεριούχα* και *αεριούχα ημιαφρώδη*. [25]

1.7 Στάδια παρασκευής

Η παρασκευή του κρασιού είναι μια φυσική διαδικασία η οποία απαιτεί ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση και βασίζεται σε πέντε βασικά στάδια: συγκομιδή, θραύση και συμπίεση, ζύμωση, διαύγαση και στη συνέχεια παλαίωση και εμφιάλωση. Κατά τη διάρκεια των χρόνων έχουν καταγραφεί πολλές παραλλαγές της πορείας παρασκευής του κρασιού συμβάλλοντας έτσι στη μοναδικότητα και την τελειότητα του κάθε κρασιού. Το κλασικό όμως πρότυπο παρασκευής περιγράφεται παρακάτω. [25]

A. Συγκομιδή:

Η συγκομιδή αποτελεί το πρώτο στάδιο στη διαδικασία παραγωγής κρασιού και εκτελείται σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, δηλαδή όταν τα σταφύλια είναι φυσιολογικά ώριμα. Η διαδικασία γίνεται είτε μηχανικά είτε με το χέρι. Παρόλη την εξέλιξη της τεχνολογίας, μέχρι και σήμερα προτιμάται η συγκομιδή με το χέρι, καθώς οι θεριστικές μηχανές μπορεί να προκαλέσουν τραυματισμούς στα σταφύλια και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό. Αφού τα σταφύλια συλλεχθούν, καταλήγουν στο οινοποιείο όπου οι οινοποιοί ταξινομούν τα τσαμπιά σταφυλιών, αφαιρώντας τα σάπια και τα πολύ ώριμα σταφύλια. [25]

B. Θραύση και συμπίεση:

Η θραύση αποτελεί το δεύτερο στάδιο παρασκευής κρασιού. Για πολλά χρόνια, οι άνθρωποι πατούσαν τα σταφύλια με τα πόδια τους. Σήμερα, χάρη στην τεχνολογία οι περισσότεροι οινοπαραγωγοί κάνουν τη διαδικασία αυτή μηχανικά χρησιμοποιώντας μηχανικές πρέσες που σπάζουν ή τρυγούν τα σταφύλια, παράγοντας τελικά αυτό που ονομάζουμε μούστο. Ο μούστος είναι ουσιαστικά ο πιεσμένος χυμός σταφυλιών που περιέχει τις φλούδες, τους σπόρους και τα στερεά μέρη του σταφυλιού. Η μηχανική συμπίεση πέρα του τεράστιου υγειονομικού κέρδους κατάφερε να προσφέρει κι άλλα

ωφέλη στη βιομηχανία του κρασιού, όπως την αύξηση της μακροζωίας, τη βελτίωση της ποιότητας του κρασιού και τη μείωση της ανάγκης για χρήση συντηρητικών.

Για την παρασκευή λευκού κρασιού η θραύση και συμπίεση γίνεται πιο γρήγορα και ακολουθεί διαχωρισμός του χυμού από τις φλούδες, αποτρέποντας έτσι το ανεπιθύμητο ερυθρό χρώμα, το οποίο προέρχεται από τη φλούδα και τη διείσδυση των τανίνων. Αντίθετα για την παρασκευή κόκκινου κρασιού ο διαχωρισμός αυτός δεν πραγματοποιείται με αποτέλεσμα η φλούδα να έρχεται σε επαφή με τον χυμό και να προσδίδει το κόκκινο αυτό χρώμα. [25]

Γ. Ζύμωση:

Η ζύμωση είναι το τρίτο στάδιο παρασκευής κρασιού το οποίο πραγματοποιείται σε δύο επιμέρους στάδια: το πρωτογενές και το δευτερογενές. Κατά το πρωτογενές στάδιο το περιεχόμενο του ζυμωτήρα, δηλαδή ο μούστος, αρχίζει φυσιολογικά να ζυμώνεται μέσα σε 6-12 ώρες παρουσία άγριων ζυμομυκήτων στον αέρα. Αυτό ενθαρρύνει την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και βοηθά στην εξαγωγή χρώματος για το κόκκινο κρασί. Σήμερα πολλοί οινοποιοί προτιμούν να παρεμβαίνουν στη διαδικασία αυτή εμβολιάζοντας το μούστο με εμπορική καλλιεργημένη μαγιά έτσι ώστε να περιορίσουν την άμεση μόλυνση από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, να εξασφαλίσουν την παρουσία ικανού αριθμού ζυμομυκτύων με ελεγχόμενη πίεση ανάπτυξης και να διαχειριστούν το χρονικό διάστημα ολοκλήρωσης τη διαδικασία της ζύμωσης. [3, 26] Μόλις ξεκινήσει η ζύμωση, συνεχίζεται μέχρι την πλήρη μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και την τελική παραγωγή ξηρού κρασιού. Κατά το δευτερογενές στάδιο η διαδικασία διακόπτεται και οι συνθήκες γίνονται αναερόβιες, ευνοώντας έτσι την αλκοολική ζύμωση. Για την παρασκευή γλυκού κρασιού η διαδικασία διακόπτεται μερικές φορές από τους οινοπαραγωγούς προτού ολοκληρωθεί η μετατροπή των σακχάρων. Σημαντική είναι η διατήρηση της θερμοκρασίας σε ένα βέλτιστο εύρος, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ώστε να παραχθεί καλύτερο άρωμα, χρώμα και να επιτραπεί η συσσώρευση των επιθυμητών προϊόντων. Η υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία αναστέλλει τη ζύμωση του κρασιού και επιτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, ικανών να προκαλέσουν επικίνδυνες ασθένειες (οξική, μαννιτική

ζύμωση κτλ). [26] Συγκεκριμένα ιδανικές θερμοκρασίες για τα κόκκινα κρασιά είναι 24 - 27°C, με τη διαδικασία να διαρκεί 3 έως 5 ημέρες, και 10 - 21°C για τα λευκά κρασιά, με τη διαδικασία να διαρκεί 7 έως 14 ημέρες.

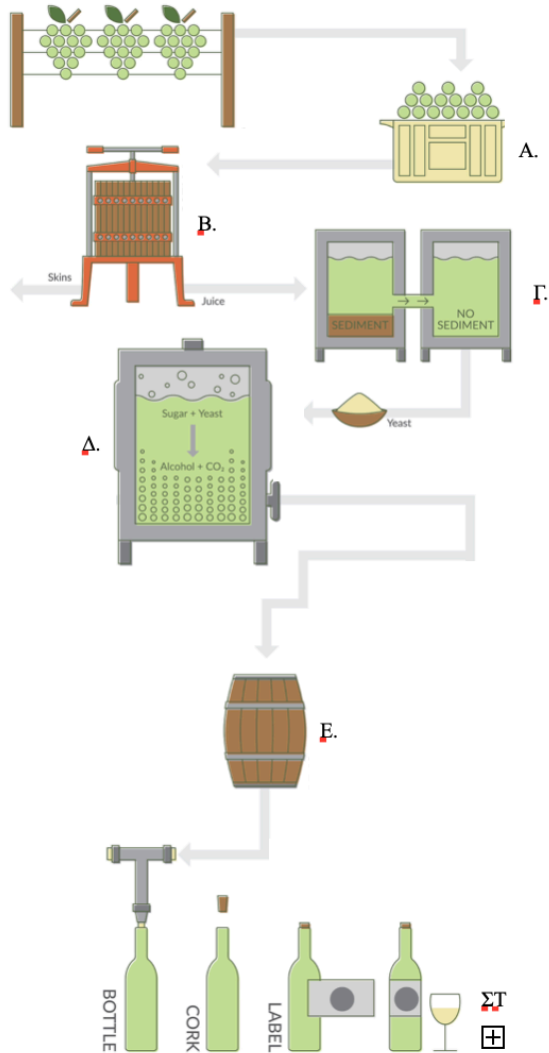
Δ. Διαύγαση:

Η διαύγαση είναι το τέταρτο στάδιο παρασκευής κρασιού όπου απομακρύνονται τα στερεά υπολείμματα όπως νεκρά κύτταρα ζυμομυκήτων, ταννίνες και πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η χρήση φίλτρου για τη λήψη των μεγαλύτερων σωματιδίων του κρασιού. Ένας δεύτερος τρόπος είναι μέσω της χρήσης ουσιών όπως ασπράδια αυγού, πηλό που προσκολλώνται με τα ανεπιθύμητα σωματίδια και έπειτα καθιζάνουν. Το υπερκείμενο είναι το διαυγές κρασί το οποίο συλλέγεται σε άλλο δοχείο. [25]

Ε. Παλαίωση και εμφιάλωση:

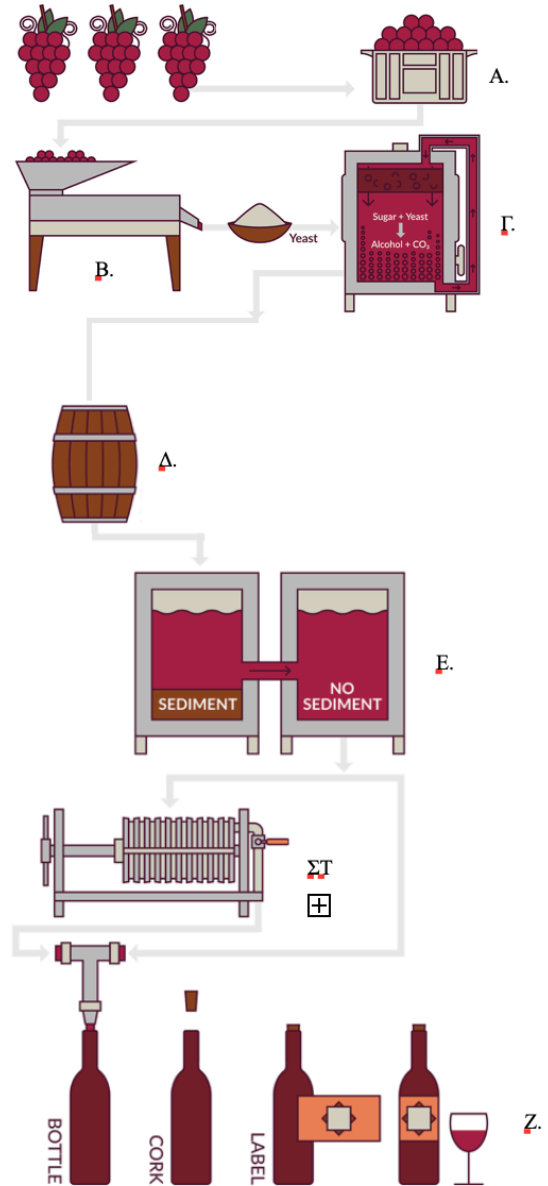
Η παλαίωση και εμφιάλωση αποτελούν το πέμπτο και τελευταίο στάδιο της διαδικασίας παραγωγής κρασιού. Ο οινοποιός μπορεί να επιλέξει ανάμεσα στην άμεση εμφιάλωση του κρασιού ή την περαιτέρω παλαίωση του. Η παλαίωση γίνεται σε φιάλες, δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα ή δρύινα βαρέλια. Στην περίπτωση που πραγματοποιείται σε βαρέλια, αυξάνεται η έκθεση του κρασιού στο οξυγόνο καθώς παλαιώνει, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των ταννινών. Η παλαίωση σε δεξαμενές χρησιμοποιείται κυρίως για την παλαίωση λευκών κρασιών. Η εμφιάλωση γίνεται είτε με φελλό είτε με βιδωτό πώμα. [25]

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΕΥΚΟΥ ΟΙΝΟΥ



A. Συγκομιδή B. Θραύση και συμπίεση Γ. Διαχωρισμός Δ. Ζύμωση και Διαύγαση E. Παλαίωση ΣΤ. Εμφυάλωση

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ



A. Συγκομιδή B. Θραύση και συμπίεση Γ. Ζύμωση και Διαύγαση Δ. Παλαίωση E. Διαχωρισμός ΣΤ. Φιλτράρισμα Ζ. Εμφυάλωση

ΣΧΗΜΑ 4: Στάδια παρασκευής ερυθρού και λευκού οίνου [27,28]

Η αμπελοκαλλιέργεια και η οινοποίηση επηρεάζεται από τρεις βασικούς παράγοντες:

1. Κλιματικές συνθήκες:

Η υγρασία, η θερμοκρασία, οι διακυμάνσεις στο κλίμα και η τοπογραφία μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την καλλιέργεια. Ευεργετική θεωρείται η σχετικά χαμηλή υγρασία (λιγότερο από 800 mm ετησίως) και η θερμοκρασία 25 - 30°C. Τέτοιες θερμοκρασίες επιτυγχάνονται από τον Απρίλιο έως τον Σεπτέμβριο, με την περίοδο αυτή να είναι καθοριστική για την ανάπτυξη των αμπελιών και την ωρίμανση των καρπών. Στην περίπτωση που οι θερμοκρασίες είναι κάτω από 10 °C, τα αμπέλια αδρανούν, ενώ σε υψηλότερες από 38 °C σταματούν την ανάπτυξη τους. Οι διακυμάνσεις στο κλίμα και την τοπογραφία των αμπελώνων συμβάλλουν στην ποικιλομορφία των κρασιών και στην ποιότητά τους. [29]

2. Έδαφος:

Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά του εδάφους αντικατοπτρίζονται στην ποικιλομορφία του κρασιού. Τα σταφύλια μπορούν να παραχθούν σε πολλά εδάφη. Πιο επιθυμητά είναι τα αμμώδη ή τα χαλκιώδη - αργιλώδη- πηλώδη, σε αντίθεση με τα αλκαλικά εδάφη τα οποία αποφεύγονται. [29]

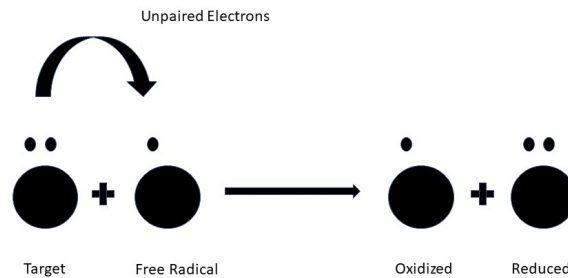
3. Πρακτικές αμπελουργίας:

Διάφορες πρακτικές εφαρμόζονται στην αμπελουργία προκειμένου να ενισχυθεί η ποιότητα και η ποσότητα του κρασιού. Για παράδειγμα γίνεται διαχωρισμός των αμπελιών σε ομοιόμορφες σειρές για διευκόλυνση της καλλιέργειας, κλάδεμα και αραίωση για τον έλεγχο των ασθενειών, των εντόμων και την επίσπευση της συγκομιδής. Επιπλέον πραγματοποιείται φύτευση καρποφόρας ποικιλίας μονοετών αμπελιών και άρδευση ανάλογα με το κλίμα και την τοπογραφία. [29]

1.8 Ελεύθερες Ρίζες

Ο όρος "ρίζα" εισήχθη για πρώτη φορά το 1786 από τον Guyton de Morveau κι έπειτα χρησιμοποιήθηκε από τους Berzelius και Gay-Lussac προκειμένου να υποδείξουν ομάδες ατόμων που βρέθηκαν αμετάβλητες σε πολλές ουσίες. [30]

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή άτομα ή μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Χαρακτηρίζονται πολύ δραστικές και ασταθείς εξαιτίας της ικανότητας τους να προσλαμβάνουν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια μέσω της διαδικασίας της οξειδωσης, ώστε να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα, ή να παρέχουν ένα ηλεκτρόνιο σε άλλα μόρια μέσω της διαδικασίας της αναγωγής. Η ακτίνα δράσης τους φτάνει τα 30Å και η διάρκεια ζωής τους είναι πολύ μικρή, από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα. Ανάμεσα στις δράσεις των ελευθέρων ριζών ανήκει η πρόκληση αναστρέψιμων ή μη, βλαβών σε βιομόρια συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊνικών οξέων, οδηγώντας σε κυτταρικές βλάβες, διαταραχή της ομοιόστασης, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παθολογικές καταστάσεις κτλ. Παρ' όλη την αρνητική τους δράση, οι ελεύθερες ρίζες κρίνονται θεμελιώδεις για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Συγκεκριμένα συμμετέχουν στη βιογένεση μιτοχονδρίων και κυττάρων, στην αποτοξίνωση, στην ενζυμική ενεργοποίηση, στη σύσπαση των μυών, στην άμυνα κτλ. [31]



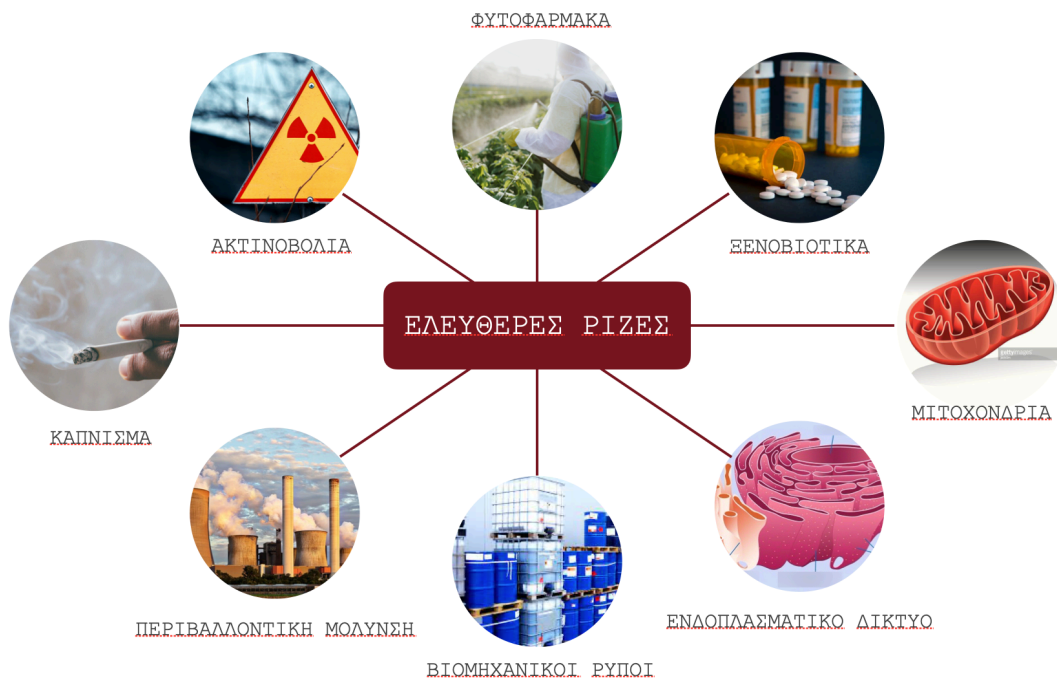
ΣΧΗΜΑ 5: Τρόπος δράσης ελευθέρων ριζών [31]

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται τόσο ενδογενώς όσο κι εξωγενώς. Παραδείγματα εξωγενών πηγών είναι ο καπνός του τσιγάρου, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, η ακτινοβολία, ορισμένα ξеноβιοτικά, βιομηχανικοί διαλύτες, Όζον κτλ. Ενδογενώς οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια όπως μιτοχόνδρια, υπεροξεισώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο κτλ μέσω διαφόρων διαδικασιών. [31]

Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται σε πέντε βασικές κατηγορίες βασισμένες στο κεντρικό τους άτομο:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) πχ $\text{OH} \cdot$
- Δραστικές μορφές αζώτου (RNS) πχ HNO_3^-
- Δραστικές μορφές θείου (RSS) πχ SO_2
- Δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) πχ HClO

- Δραστικές μορφές σεληνίου (RSeS) πχ υπολείμματα σεληνοκυστεΐνης [32]



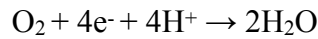
ΣΧΗΜΑ 6: Πηγές ελευθέρων ριζών

Στις δραστικές μορφές συμπεριλαμβάνονται και μη ρίζες οι οποίες δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, κι ως εκ τούτου, δεν είναι ελεύθερες ρίζες. Τέτοια παραδείγματα είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3), ο δραστικός περοξυνιτρίτης ($ONOO^-$) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Οι ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο (ROS) αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς. Συντίθενται κυρίως στα μιτοχόνδρια κατά τη διαδικασία της αερόβιας αναπνοής και λιγότερο από την οξειδάση της ξανθίνης, την NADPH οξειδάση κατά τη φαγοκύτωση κτλ. [31]

1.8.1 Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια

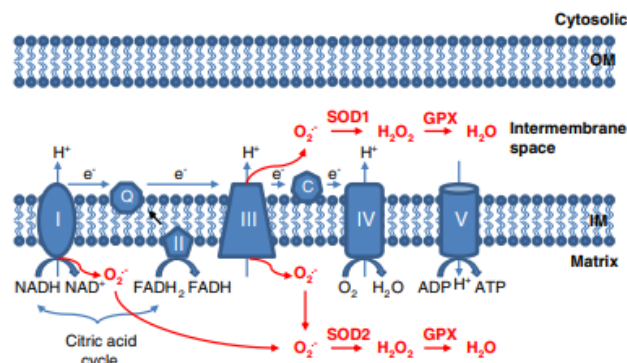
Το 95-99% των ηλεκτρονίων (e^-) που προέρχονται από NADH και $FADH_2$ περνούν μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και χρησιμοποιούν το O_2 ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων σχηματίζοντας H_2O στο σύμπλοκο IV (κυτοχρωμική οξειδάση). Κατά την αντίδραση αυτή, προσλαμβάνονται 4 ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα C και χρησιμοποιούνται για την αναγωγή ενός μορίου O_2 σε δύο μόρια νερού σύμφωνα με την αντίδραση 1:



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 2: Αναγωγή μοριακού οξυγόνου στα μιτοχόνδρια

Ωστόσο, περίπου 0,1-2% των ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα στα σύμπλοκα I και III σχηματίζεται O_2^- το οποίο απελευθερώνεται τόσο προς τη μήτρα όσο και προς το διαμεμβρανικό χώρο, όπου δρα η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) ώστε να μετατρέψει το O_2^- σε H_2O_2 . Τόσο το O_2^- όσο και το H_2O_2 που παράγονται σε αυτή τη διαδικασία θεωρούνται ROS.

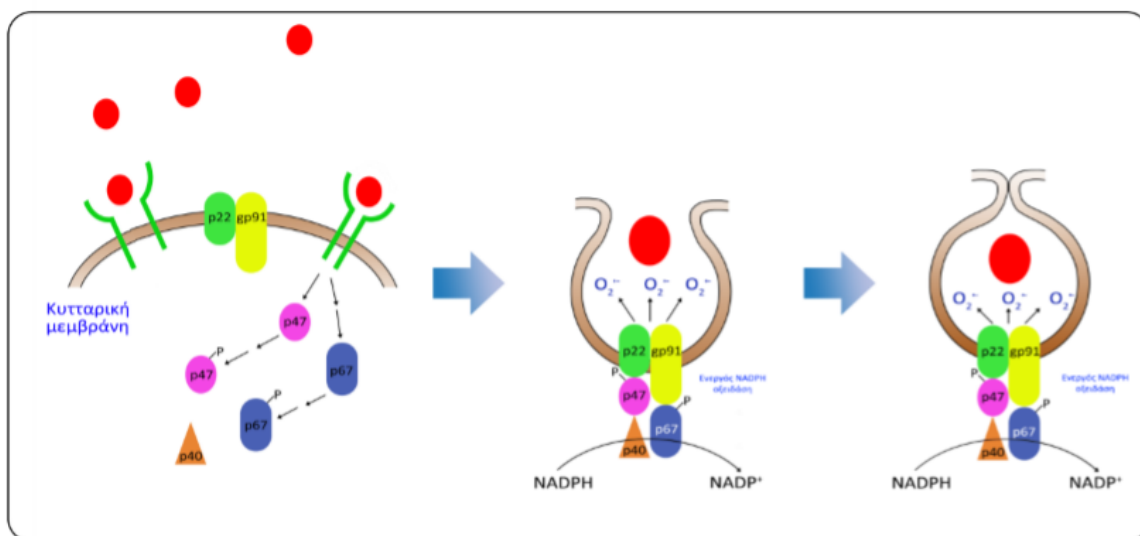
Η μιτοχονδριακή οξειδοαναγωγική σηματοδότηση εμπλέκεται στην ενεργοποίηση αποκρίσεων κατά την υποξία και στην διαχείριση των οξειδωτικών που βρίσκονται σε άλλα διαμερίσματα εκτός του μιτοχονδρίου. [33]



ΣΧΗΜΑ 7: Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια [33]

1.8.2 Παραγωγή ROS μέσω φαγοκύττωσης

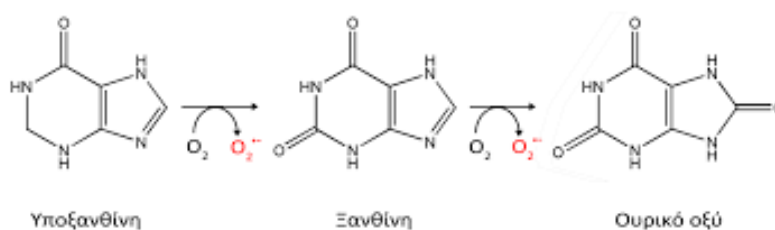
Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα μπορούν να αυξάνουν την κατανάλωση του οξυγόνου (~100 φορές) και να παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^- όταν διεγείρονται προκειμένου να καταστρέψουν τις εισβαλόμενες ξένες ουσίες. Το παραγόμενο O_2^- προκύπτει μέσω της αναγωγής του O_2 . Την αντίδραση αυτή καταλύει ένα ενζυμικό σύμπλοκο, η NADPH οξειδάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το φωσφορικό νικοτιναμίδιο-αδενινο-φωσφορικό-δινουκλεοτίδιο (NADPH). Η ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού επάγεται από την πρόσδεση διαφόρων ουσιών σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων, τους TLR (toll-like receptors) επάγοντας μια σειρά αλυσιδοτών αντιδράσεων προκειμένου να σχηματιστεί η ενεργοποιημένη μορφή του ενζύμου NADPH οξειδάση, να δημιουργηθεί μια εγκόλπωση παγιδεύοντας την ξένη ουσία μέσα σε ένα κυστίδιο και παράγοντας μεγάλες ποσότητες O_2^- με σκοπό την τελική εξουδετέρωση της ξένης ουσίας.



ΣΧΗΜΑ 8: Παραγωγή ROS μέσω φαγοκύτωσης

1.8.3 Παραγωγή ROS από την οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση τόσο της υποξανθίνης όσο και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, στο ήπαρ και στους νεφρούς, με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε O_2^- και H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση 3.



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 3: Παραγωγή ROS από την οξειδάση της ξανθίνης

Το ένζυμο αυτό προκύπτει μέσω οξείδωσης θειολικών ομάδων (-SH) ή μέσω μερικής πρωτεόλυσης του ενζύμου αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH), σε περιπτώσεις τραυματισμού κάποιου ιστού. Σε φυσιολογικές συνθήκες όμως η οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ γίνεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH), η οποία ανάγει το NAD^+ σε $NADH$ κι όχι το O_2 σε O_2^- .

1.9 Οξειδωτικό στρες

Ο Sies ήταν ο πρώτος ο οποίος εισήγαγε τον όρο «οξειδωτικό στρες» το 1985, για να δείξει την ανισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, η οποία οδηγεί σε δυσμενείς επιδράσεις. Οι δυσμενείς αυτές επιδράσεις γίνονται αντιληπτές μόνο όταν διαταραχτεί η οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων. [34]

Σήμερα οξειδωτικό στρες ορίζουμε μια δυσμενή κατάσταση όπου προκύπτει σε ένα βιολογικό σύστημα εξαιτίας της διατάραξης της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα μπορεί να είναι αποτέλεσμα αυξημένου σχηματισμού ελευθέρων ριζών ή μειωμένης συγκέντρωσης, δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ή συνδυασμός των δύο παραπάνω. [35]

Δεδομένης της τεράστιας ποικιλίας προ-οξειδωτικών, αντιοξειδωτικών ενώσεων κι ενζύμων, έχουν ταξινομηθεί διάφορες υπομορφές οξειδωτικού στρες κι έχει εισαχθεί μια κλίμακα έντασης που κυμαίνεται από το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες (eustress) έως το υπερβολικό και τοξικό οξειδωτικό στρες (distress), όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. [32]

Intensity	Basal oxidative stress (oxidative eustress, physiological oxidative stress, positive oxidative stress) Low-, intermediate-, high-intensity oxidative stress Low: oxidative eustress High: oxidative distress Acute, chronic, repetitive oxidative stress
Specific forms	Physiological oxidative stress (eustress) Nutritional, dietary, postprandial oxidative stress Glyco-oxidative stress (AGE) ER stress, proteotoxic stress, disulfide stress Photooxidative stress [ultraviolet (UV-A, UV-B), visible, infrared-A] Radiation-induced oxidative stress Nitrosative stress Nanoparticle-induced oxidative stress Environmental stress (sulfur dioxide, nitrogen dioxide, ozone)
Related terms	Oxidant stress, prooxidant stress Shear stress Redox stress, electrophilic stress Reductive stress, hypoxic stress Energy stress
Related responses of stress signaling	Heat shock response Unfolded protein response Cell proliferation

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Υπομορφές οξειδωτικού στρες [32]

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν βιομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας βλάβες σε αυτά. Μερικές από τις επιπτώσεις περιγράφονται παρακάτω.

1.9.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι ένας από τους κυριότερους στόχους των ελευθέρων ριζών όπου είναι δυνατόν να υποστούν οξειδωτικές τροποποιήσεις χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στη δομή και στη λειτουργικότητά τους. Μόνο όταν θιγούν απαραίτητα αμινοξέα (πχ κυστεΐνη, ιστιδίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η προλίνη) ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο επηρεάζεται η γενικότερη λειτουργία τους. [32] Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις, που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να είναι τόσο αναστρέψιμες όσο και μη αναστρέψιμες. Στις μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις ανήκει η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών και η νιτροποίηση του αμινοξέος τυροσίνη, η δράση των οποίων μπορεί να είναι τόσο επιβλαβής όσο κι ευεργετική για τα κύτταρα υπό συνθήκες στρες. Στην περίπτωση της καρβονυλίωσης, οι καρβονυλικές ομάδες δεν μεταβολίζονται στα πρωτεασώματα και στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στον οργανισμό πρωτεΐνες οι οποίες έχουν χάσει την λειτουργία ή /και τη διαμόρφωση τους. Στις αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις ανήκει η τροποποίηση του αμινοξέος κυστεΐνη, με αποτέλεσμα την πρόκληση αλλαγών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται με την οξειδοαναγωγή και την προστασία πρωτεϊνών στόχων από περαιτέρω βλάβες.

1.9.2 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε νουκλεϊκά οξέα

Οι πολλαπλές βιοχημικές αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκεται το οξυγόνο οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών τοξικών ενδιάμεσων ικανών να προκαλέσουν βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα. Στις βλάβες περιλαμβάνονται η σχάση μονής ή/και διπλής νουκλεοτιδικής αλυσίδας, η οξείδωση νουκλεοτιδικών βάσεων, η αποπουρίνωση/ αποπυριμιδίωση, η χημική τροποποίηση του τμήματος σακχάρου, η καταστολή μηχανισμών επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού και η αντίδραση με πυρηνικές πρωτεΐνες. [31] Ιδιαίτερα ευαίσθητα στη οξείδωση είναι το μιτοχονδριακό DNA και το RNA σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA και του RNA δεν οργανώνονται σε συμπαγή διάταξη και δεν συνδέονται με ιστόνες, όπως το πυρηνικό DNA. Επίσης, το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται κοντά στην αναπνευστική αλυσίδα, την κύρια πηγή δημιουργίας ROS. [35]

Μεταξύ των βάσεων DNA, η γουανίνη είναι πιο ευαίσθητη σε οξειδωτική βλάβη. Συγκεκριμένα η οξείδωση της γουανίνης οδηγεί στην παραγωγή 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης, η οποία ζευγαρώνει με την αδενίνη κι όχι με την κυτοσίνη προκαλώντας έτσι μεταλλάξεις στο DNA υπεύθυνες για τη γήρανση και την καρκινογένεση. [32, 35] Πέρα των επιπτώσεων στα νουκλεϊκά οξέα, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν και με τις πυρηνικές πρωτεΐνες, δημιουργώντας νέες ελεύθερες ρίζες. Οι νεοσυντιθέμενες αυτές ρίζες συνδέονται με το DNA εμποδίζοντας το ξεδίπλωμα της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA και την εκτέλεση των διαδικασιών σύνθεσης νέου DNA ή RNA. Υποστηρίζεται ότι το πιο επιθετικό είδος υπεύθυνο για την οξείδωση

ή τροποποίηση του DNA είναι η ρίζα υδροξυλίου παρουσία κάποιου μετάλλου πχ σίδηρος. [36]

1.9.3 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε λιπίδια

Ένας ακόμη στόχος των ελευθέρων ριζών είναι οι κυτταρικές μεμβράνες εξαιτίας της αυξημένης σύστασης τους σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Οι ελεύθερες ρίζες και ιδιαίτερα οι ROS προσβάλλουν τα λιπαρά αυτά οξέα προκαλώντας την οξείδωση τους και την παραγωγή αντιδραστικών ενδιάμεσων ικανών να διαδώσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως «λιπιδική υπεροξειδωση» και μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενζυμικής ή μη ενζυμικής οδού. [35, 37]

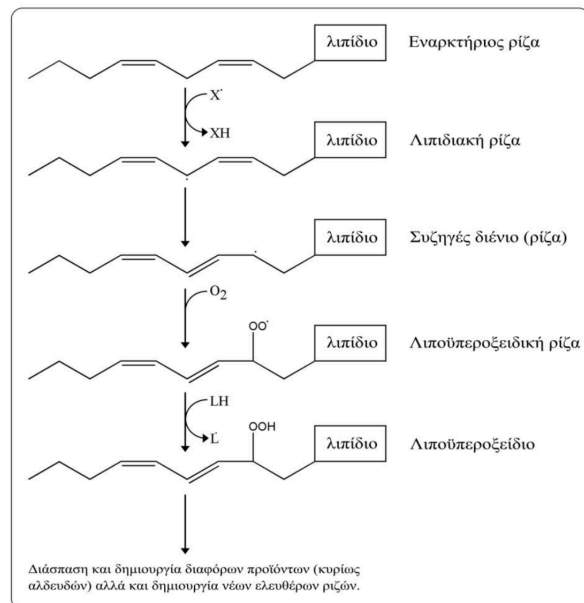
Ενζυμική υπεροξειδωση:

Η ενζυμική υπεροξειδωση απαιτεί τη δράση του ενζύμου λιποξυγενάση (LOX). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το αραχιδονικό (C20: 4) ή το λινολεϊκό οξύ (C18: 2) σχηματίζοντας ομάδες υδροϋπεροξυλίου, παρουσία μοριακού οξυγόνου. [37]

Μη ενζυμική υπεροξειδωση:

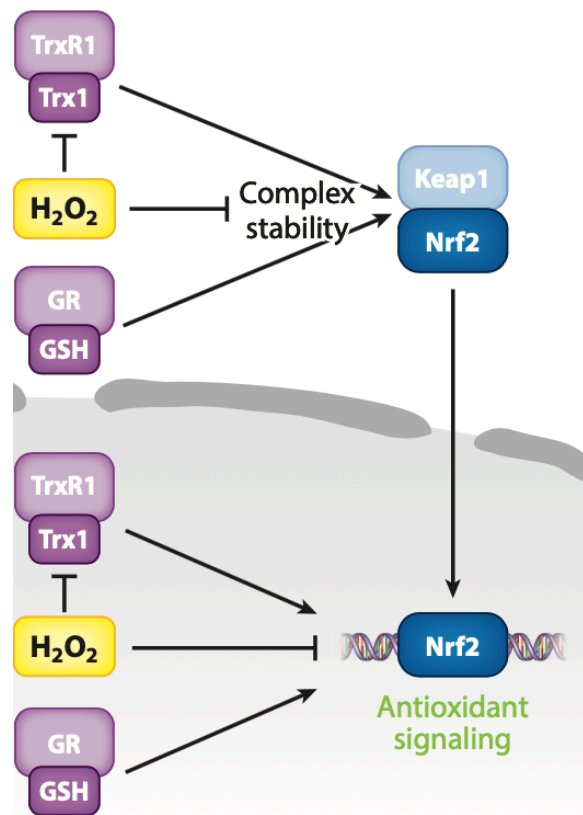
Η μη ενζυμική οδός (PL) χωρίζεται σε τρία στάδια:

Το πρώτο στάδιο είναι η έναρξη όπου η πολυακόρεστη αλυσίδα ενός PL προσβάλλεται από μία ελεύθερη ρίζα και οξειδώνεται σχηματίζοντας μία νέα ελεύθερη ρίζα $R\cdot$ πολύ ασταθή. Δεύτερο στάδιο είναι ο πολλαπλασιασμός όπου η νεοσχηματισμένη, ασταθής ελεύθερη ρίζα $R\cdot$ ανασυνδιάζεται με ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς σχηματίζοντας συζηγές διένιο με μία νέα ελεύθερη ρίζα στο άτομο άνθρακα του διπλού δεσμού. Η νέα ελεύθερη ρίζα είναι σχετικά πιο σταθερή και αντιδρά με μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου ($ROO\cdot$). Τρίτο στάδιο είναι ο τερματισμός κατά τον οποίο η ρίζα $ROO\cdot$ αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας έτσι μια νέα ελεύθερη ρίζα κι ένα υπεροξειδίο λιπαρού οξέος ($ROOH$). [37]



ΣΧΗΜΑ 9: Μη ενζυμική οδός λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η διάσπαση των υπεροξειδίων λιπαρών οξέων πραγματοποιείται μέσω διαφόρων πολύπλοκων μηχανισμών σχηματίζοντας πολλά προϊόντα όπως μηλονική διαλδεύδη, 4-υδροξυ-2-νονενάλη κτλ. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να διαδώσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις έχοντας καταστρεπτικές συνέπειες όπως την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ως επακόλουθο την μείωση του δυναμικού δράσης, την ανεξέλεγκτη εισροή, εκροή κυτταρικών συστατικών και τελικά την απόπτωση δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μια ακόμη συνέπεια της λιπιδικής υπεροξειδωσίας αποτελεί η ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μέσω σύνδεσης με συγκεκριμένα κατάλοιπα πρωτεϊνών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η σύνδεση προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσίας με κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης Keap1, οδηγώντας στην αναστολή της δράσης της. Έτσι χάνεται η ικανότητα της Keap1 να ουβικιτινώνει τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, επιτρέποντάς του να συσσωρεύεται στον πυρήνα και να προκαλεί την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που στοχεύουν στην παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών κι ενζύμων. Ένας ακόμη ρυθμιστής του Nrf2 είναι η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR1). [32, 37]



ΣΧΗΜΑ10: Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσίας: Η πρόσδεση λιπιδικών υπεροξειδίων σε κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης Keap 1 οδηγεί σε καταστολή της δράσης της. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 δεν αναστέλλεται ή ενεργοποιείται από την TrxR1, συσσωρεύεται στον πυρήνα και προκαλεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. [32]

1.10 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες δρουν ενάντια στις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες, προκειμένου να αποτρέψουν, να μειώσουν ή να αποκαταστήσουν μια βλάβη προκαλούμενη από αυτές. Η δράση τους μπορεί να είναι άμεση, μέσω άμεσης σάρωσης των ελευθέρων ριζών, ή έμμεση, μέσω επίδρασης σε διάφορες οδούς σηματοδότησης και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η φύση των αντιοξειδωτικών, η κατάσταση της οξειδωσίας, οι ιδιότητες του οξειδωμένου υποστρώματος και το επίπεδο οξειδωσίας.

Με βάση την προέλευση τους, τα αντιοξειδωτικά ταξινομούνται ως εξωγενή, αυτά που προσλαμβάνονται μέσω διατροφής και ενδογενή, αυτά που παράγονται φυσιολογικά στους ζωντανούς οργανισμούς.

Με βάση τον τρόπο δράσης τους, τα αντιοξειδωτικά ταξινομούνται ως ενζυμικά και μη ενζυμικά. [38, 39]

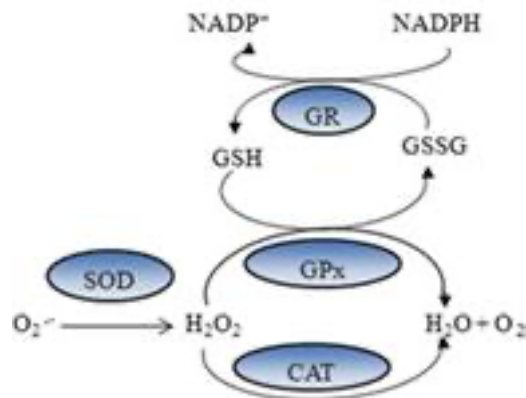
1.10.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται στα πρωτογενή και τα δευτερογενή. Τα πρώτα εξαλείφουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες ενώ τα δεύτερα έμμεσα, μέσω μείωσης των επιπέδων ελευθέρων ριζών ή διατήρησης σταθερής παροχής μεταβολικών ενδιάμεσων όπως NADPH, γλουταθειόνη, κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα κτλ. [40]



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Πρωτογενή και δευτερογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ελεύθερων ριζών βρίσκεται η SOD η οποία καταλύει τη διάσπαση της ρίζας ανιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) με αναγωγή. Το H_2O_2 που σχηματίζεται μετατρέπεται σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2) με τη δράση του ενζύμου καταλάση (CAT) ή σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και νερό (H_2O) με τη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Στην περίπτωση που τα επίπεδα του H_2O_2 είναι φυσιολογικά ή χαμηλά αναλαμβάνει δράση η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Ενώ στην περίπτωση που τα επίπεδα του H_2O_2 είναι υψηλά τότε αναλαμβάνει το ένζυμο καταλάση. Όλα αυτά βρίσκονται υπό μεταγραφικό, μεταφραστικό και μεταμεταφραστικό έλεγχο, αποτελώντας τη βάση των προσαρμοστικών αποκρίσεων στο οξειδωτικό στρες. [38, 40]



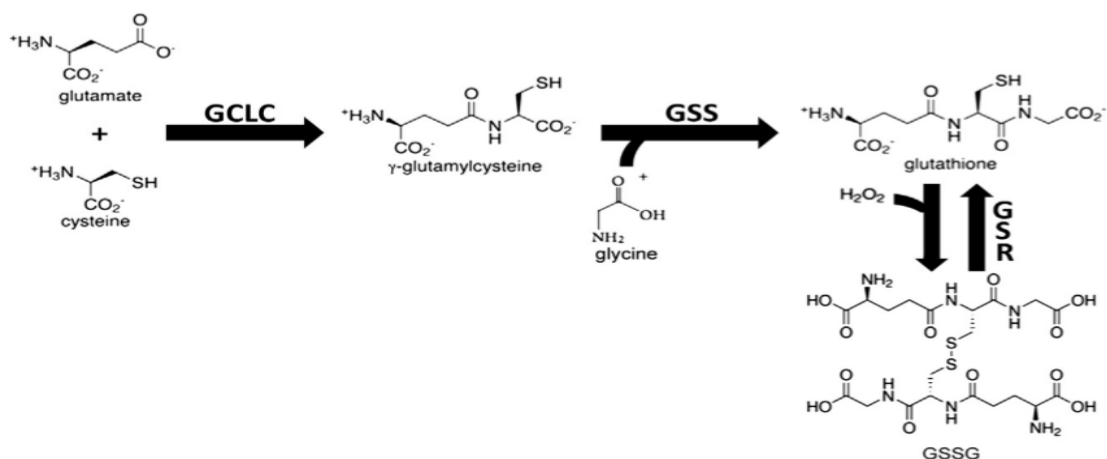
ΣΧΗΜΑ 11: Εξουδετέρωση $O_2^{\bullet -}$ μέσω δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων [40]

1.10.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε μεταβολικά και θρεπτικά αντιοξειδωτικά. Τα μεταβολικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η μελατονίνη κ.λπ. Ενώ τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στα εξωγενή αντιοξειδωτικά και είναι ενώσεις που δεν μπορούν να παραχθούν στον οργανισμό αλλά πρέπει να παρέχονται μέσω διατροφής ή συμπληρωμάτων. Τέτοια παραδείγματα είναι η βιταμίνη C, βιταμίνη E, συνένζυμο Q10, πολυφαινόλες, διάφορα ιχνοστοιχεία κ.λπ. [11, 12, 38]

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται από τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλυκίνη, γλουταμινικό και παράγεται σε όλα τα κύτταρα κυρίως όμως στα ηπατικά λόγω των αυξημένων αποτοξινωτικών αναγκών του οργάνου αυτού. [31] Αποτελεί ισχυρό ενδογενές, μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό εξαιτίας της ομάδας θείου που εντοπίζεται στην κυστεΐνη, η οποία δρα ως αναγωγικός παράγοντας ικανός να εξουδετερώσει μια ποικιλία ελευθέρων ριζών. [35] Η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης λαμβάνει μέρος στο κυτταρόπλασμα και πραγματοποιείται σε 2 στάδια: Στο πρώτο στάδιο η συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCLC) καταλύει το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του γλουταμικού και της κυστεΐνης από όπου προκύπτει γ-γλουταμυλοκυστεΐνη. Στο δεύτερο στάδιο η συνθετάση της γλουταθειόνης (GSS) καταλύει την προσθήκη γλυκίνης με τελικό προϊόν τη γλουταθειόνη όπως φαίνεται παρακάτω.

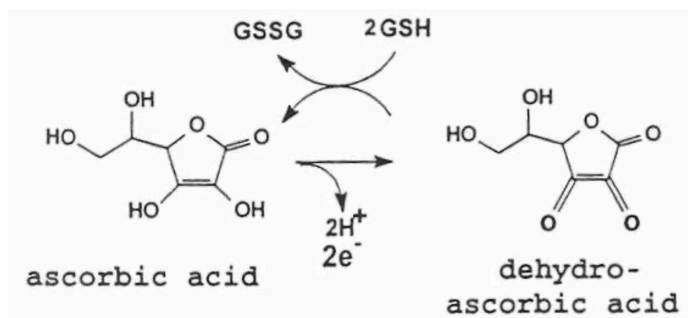


ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 4: Στάδια σύνθεσης της γλουταθειόνης

Στα κύτταρα, η γλουταθειόνη εντοπίζεται σε δύο μόρφες: την οξειδωμένη (GSSG) και την ανηγμένη (GSH). Η GSH είναι αυτή η οποία αναλαμβάνει την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών μέσω οξείδωσης της. Σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες αυξάνονται τα επίπεδα της GSH και μειώνονται της GSSG. Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες. Πέρα της αναγωγικής της δράσης, η γλουταθειόνη λειτουργεί κι ως συμπαράγοντας αρκετών αποτοξινωτικών ενζύμων έναντι του οξειδωτικού στρες πχ. τρανσφεράση της γλουταθειόνης, παίζει ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση, στην μεταφορά ιόντων, αμινοξέων, στον μεταβολισμό των βιταμινών E και C κτλ. [31]

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή το ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο που συντίθεται στα εσπεριδοειδή, στις πατάτες, στις ντομάτες, στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και σε μερικά ζώα. Οι άνθρωποι δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν L-ασκορβικό οξύ από D-γλυκόζη λόγω της απουσίας του ενζύμου L-gulonolactone oxidase (GULO). Ως εκ τούτου, πρέπει να το λαμβάνουν μέσω της διατροφής τους. Συμμετέχει σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως στη σύνθεση του κολλαγόνου, της καρνιτίνης, των νευροδιαβιβαστών και στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό του σώματος, για τον λόγο αυτό εντοπίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στους ιστούς όπου υποστούν οξειδωτικό στρες. [31] Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης C οφείλεται κυρίως στην ικανότητα της να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου, υπερονιτρίτη και υδροϋπεροξειδία λιπιδίων σύμφωνα με την αντίδραση:



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 5: Οξείδωση ασκορβικού οξέος

Το ασκορβικό οξύ, δηλαδή η ανηγμένη μορφή της βιταμίνης C, προσφέρει ηλεκτρόνια και πρωτόνια κι έτσι μετατρέπεται στην οξειδωμένη μορφή η οποία είναι το δεϋδροασκορβικό οξύ. Στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί ξανά σε ασκορβικό οξύ με δότη ηλεκτρονίων και πρωτονίων την γλουταθειόνη (GSH). [41]

Επιπλέον λόγοι, στους οποίους οφείλεται η αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης C είναι:

- Η αναστολή ενεργοποίησης των ενζύμων NADPH οξειδάση και οξειδάση της ξανθίνης.
- Η μείωση της διαρροής ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια.
- Η αναστολής της έκφρασης του iNOS, αποτρέποντας έτσι την παραγωγή NO και υπεροξυνιτρικού.
- Η αναγέννηση αντιοξειδωτικών όπως γλουταθειόνη, ουρικό, βιταμίνη E κτλ
- Η συνεργιστική δράση με την βιταμίνη E για απόσβεση του οξυγόνου των ελεύθερων ριζών και του μονήρους.

Παρόλη την ευεργετική της δράση, η βιταμίνη C μπορεί να συμβάλει και αρνητικά στον οργανισμό οδηγώντας στο σχηματισμό οξειδωτικής βλάβης. Αυτό συμβαίνει όταν ανάγεται ο σίδηρος Fe^{3+} σε Fe^{2+} κι ο χαλκός Cu^{2+} σε Cu^+ , στοιχεία τα οποία στη συνέχεια μπορούν να μετατρέψουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet). [41]

Στο παρελθόν και δυστυχώς ακόμη προς το παρόν, έχει χρησιμοποιηθεί μη ειδική αντιοξειδωτική θεραπεία για τη θεραπεία ποικίλων ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, υποδεικνύοντας ότι «ακόμα ευρέως θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών θα παρέχει πάντα όφελος». Αυτή είναι αφελής σκέψη. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να προστατεύσουν ή να αυξήσουν τον τραυματισμό ανάλογα με

την κατάσταση και επομένως η χρήση τους πρέπει πάντα να γίνεται με πλήρη εκτίμηση της κατάστασης» . [42]

1.11 Δείκτες οξειδωτικού στρες και πειραματικά στάδια

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, της εξέλιξης μίας νόσου καθώς και των επιδράσεων των αντιοξειδωτικών στην υγεία του ανθρώπου. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον μελέτης τους κι ο εντοπισμός τους σε πολλές έρευνες. Ωστόσο, για μερικούς δείκτες υπάρχει έλλειψη συναίνεσης σχετικά με την επικύρωση, την τυποποίηση και την αναπαραγωγιμότητα.

Η μέτρηση σταθερών δεικτών οξειδωτικού στρες βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με το μικροπεριβάλλον και την τροποποίηση του. Τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα είναι παραδείγματα μορίων που μπορούν να τροποποιηθούν από τις ελεύθερες ρίζες. Μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν την λειτουργία των μορίων, αναστέλλουν ενζυμικές αντιδράσεις κτλ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μέτρηση της μηλονικής διαλδεύδης (malonaldehyde-MDA) και της 4-υδροξυονοπενάλης (4-hydroxynonenal-HNE), ως δείκτες λιπιδικής υπεροξείδωσης. Συγκεκριμένα η παρουσία ακόρεστων διπλών δεσμών καθιστά τα PUFA πολύ ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη προκαλούμενη κυρίως από τις ελεύθερες ρίζες $\text{OH}\cdot$ και $\text{ROO}\cdot$. Οι ρίζες αυτές καταλύουν την οξείδωση του λιπαρού οξέος, δημιουργώντας μια ρίζα ικανή να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο και να σχηματιστεί μία ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου. Η αντίδραση προχωρά με τη λιπιδική υπεροξυλική ρίζα να αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας έτσι μια νέα ελεύθερη ρίζα κι ένα υπεροξειδίο λιπαρού οξέος. Η διάσπαση των υπεροξειδίων λιπαρών οξέων παράγει πολλά προϊόντα όπως μηλονική διαλδεύδη (MDA) και 4-υδροξυονοπενάλη (HNE). Η HNE μπορεί να ανιχνευθεί με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) απευθείας, ή ως παραγωγοποιημένο προϊόν με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη ή 1,3-κυκλοεξα-νιδόνη, με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) και με μέσα ανοσολογικών τεχνικών που χρησιμοποιούν ειδικά αντισώματα κατά της HNE. Η MDA είναι μια ουσία ικανή να αντιδρά με δύο ισοδύναμα θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) παράγοντας ένα ροζ σύμπλοκο προσθήκης, το οποίο μετρίεται εύκολα με χρωματομετρική ή φθοριομετρική ανάλυση. Διάφορα άλλα παραδείγματα δεικτών οξειδωτικού στρες χρησιμοποιούνται ευρέως, με μερικά παραδείγματα να φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. [37]

Markers	Methods	Limitations and confoundings
<i>Lipid oxidation</i>		
HNE	HPLC, GC-MS Immunoassay	
MDA, alkenals, alkadienals	Spectrophotometric/fluorimetric (TBARS), HPLC (UV or fluorescence) Immunoassay	Sugars, amino acids, bilirubin and albumin, hemolysis
F2-IsoPs	Gas/liquid chromatography coupled with mass spectroscopy techniques Immunoassay	Hemolysis Antibody specificity
<i>DNA oxidation</i>		
8oxodG, 5-chlorocytosine, 5-chlorouracil, edA, edC	ELISA assays, HPLC-ECD, HPLC/GC-MS	Antibody specificity
<i>Protein oxidation</i>		
ALEs, AGEs	HPLC, Western blot after one-dimensional or two-dimensional electrophoretic separation, immunohistochemistry, ELISA	Structural heterogeneity of these products Antibody specificity
Carbonils	Spectrophotometric, HPLC, ELISA	
3-NO-Tyr	HPLC/GC-MS, ELISA	Possible nitration of tyrosine residues in the sample by the presence of nitrite and the acid conditions during protein precipitation and hydrolysis Antibody specificity
AOPP	MS, colorimetric assays	
oxLDL	Immunodetection (ELISA)	Antibody specificity
IMA	ABC test, immunodetection (ELISA)	Sensitive to pH changes, temperature, and time of sample storage Antibody specificity

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Δείκτες οξειδωτικού στρες [37]

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης μίας υπο εξέτασης ουσίας πραγματοποιείται σε 3 στάδια: *in vitro*, *in silico* και *in vivo*.

Ο όρος *in silico* αναφέρεται στη δοκιμή που πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης υπολογιστή. Αντιπροσωπεύει μια σχετικά νέα οδό έρευνας, η οποία έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες πρόβλεψης της δράσης των φαρμάκων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πριν από τα *in vitro* πειράματα.

Ο όρος *in vitro* («έν ύαλω» δηλ. «μέσα στο γυαλί») αναφέρεται στην δοκιμή εκτέλεσης μιας δεδομένης πειραματικής διαδικασίας, σε ελεγχόμενες συνθήκες, έξω από έναν ζωντανό οργανισμό. Συνήθως περιλαμβάνει μεμονωμένους ιστούς, μικροοργανισμούς, κύτταρα ή βιολογικά μόρια εκτός του κανονικού βιολογικού τους πλαισίου. Στην περίπτωση μελέτης επαγωγής οξειδωτικού στρες ή αντιοξειδωτικής δράσης μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μέθοδοι. Μία από αυτές είναι η φασματοφωτομετρία, η οποία αποτελεί μια γρήγορη κι εύκολη μέθοδος, με το μειονέκτημα όμως ότι όλες οι μετρήσεις των εξωκυτταρικών ελεύθερων ριζών επηρεάζονται από τον αριθμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαγωγή μη έγκυρων αποτελεσμάτων. Μία άλλη μέθοδος είναι η κυτταρομετρία ροής η οποία αποτελεί ισχυρό επιστημονικό εργαλείο. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλοί φθορίζοντες ανιχνευτές για την ανίχνευση αντιδρώντων

ειδών, με διαφορετικό βαθμό ειδικότητας και ευαισθησίας πχ DCFH-DA, DAF-2 DA, DAF-FM DA για ανίχνευση ROS/RNS.

Ο όρος *in vivo* («έν ζωή») αναφέρεται στον πειραματισμό χρησιμοποιώντας ολόκληρους ζωντανούς οργανισμούς, συνήθως ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων και φυτών. Συχνά πραγματοποιούνται έπειτα από *in vitro* πειράματα εξαιτίας της μεγάλης αξιοπιστίας και καταλληλότητας τους για παρατήρηση των συνολικών επιπτώσεων σε έναν ζωντανό οργανισμό. Οι κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους και οι μελέτες σε ζώα αποτελούν δύο μορφές έρευνας *in vivo*. Όσον αφορά τις μελέτες σε ζώα, η επιλογή των ειδών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τον τύπο, τον στόχο, τη μέθοδο της έρευνας, χαρακτηριστικά, προέλευση των ζώων κτλ. Τα κυριότερα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται στις έρευνες είναι τα ποντίκια, οι αρουραίοι, η ζέβρα, οι βάτραχοι, τα κουνέλια, οι γάτες, οι σκύλοι και τα πρωτεύοντα ζώα, πλην του ανθρώπου. [43]

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), η έρευνα σε ζώα ρυθμίζεται βάσει της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ όπου:

" Τα ζώα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην έρευνα στην ΕΕ μόνο όταν υπάρχει πειστική επιστημονική αιτιολόγηση, όταν τα αναμενόμενα οφέλη της έρευνας υπερτερούν των πιθανών κινδύνων όσον αφορά την ταλαιπωρία των ζώων και όταν οι επιστημονικοί στόχοι δεν μπορούν να επιτευχθούν με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων χωρίς ζώα. Μόνο έργα που πληρούν αυτές τις απαιτήσεις εγκρίνονται."

2. ΣΚΟΠΟΣ

Το υψηλά πολυφαινολικό περιεχόμενο των κόκκινων κρασιών και η πιθανή αντιοξειδωτική/ευεργετική για την υγεία δράση που μπορεί να έχουν, θέτουν ως σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας την εκτίμηση διαφόρων δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα και ιστούς επιμύων έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος ξινόμαυρου κρασιού. Οι ιστοί οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν οι εξής: εγκέφαλος, μάτια, πνεύμονες, καρδιά, ήπαρ, στόμαχος, πάγκρεας, σπλήνα, νεφροί, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, όρχεις και τετρακέφαλος μύς. Οι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που εξετάστηκαν ήταν η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η δραστηριότητα των ενζύμων περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και καταλάσης (CAT).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

3.1.1 Ζώα και συνθήκες διαβίωσης

Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 12 αρσενικοί επιμύες φυλής Wistar, ηλικίας 20 εβδομάδων προερχόμενοι από το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Κτηνιατρικής σχολής του ΑΠΘ. Έπειτα οι επιμύες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες των 6 και στεγάστηκαν σε κλουβιά (3 επιμύες ανά κλουβί) με θερμοκρασία $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία 40-70% και τεχνητό φωτισμό με 12ωρη φωτοπερίοδο ημέρας/νύκτας. Κάθε ζώο σημάνθηκε με οικολογικό χρώμα στο τρίχωμά του προκειμένου να αναγνωρίζεται. Ακολούθησε περίοδος προσαρμογής διάρκειας μιας εβδομάδας με σκοπό τον εγκλιματισμό των επιμύων. Κατά την διάρκεια του πειραματισμού, καθημερινά και κατά βούληση, παρέχονταν νερό και ξηρά τροφή με μορφή σύμπτκτων (pellets) προοριζόμενη για ζώα εργαστηρίου. Ο χειρισμός και η ευθανασία των πειραματόζωων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες για την φροντίδα και διαχείριση των ζώων εργαστηρίου της ΕΕ.

3.1.2 Εκχύλισμα και προετοιμασία δόσης

Το εκχύλισμα παρασκευάστηκε από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του ΕΚΠΑ με τη χρήση κρασιού ποικιλίας Ξινόμαυρου. Η συγκεκριμένη ποικιλία επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί εξαιτίας της μεγαλύτερης συγκέντρωσης φαινολικού φορτίου που περιέχει σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες κρασιών. Το κρασί συμπυκνώθηκε σε Rotavapor μέχρι μείωσης του όγκου του στο μισό, ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης. Η αιθανόλη εντοπίζεται φυσικά στο κρασί και η παρουσία της παρεμποδίζει την κατακράτηση των πολυφαινολών από την ρητίνη. Ακολούθως έγινε προσρόφηση των πολυφαινολών με τη χρήση πολυμερικής ρητίνης και ανάκτηση με τη χρήση οργανικού διαλύτη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση του δείγματος σε Rotavapor και λυοφιλιοποίησή του με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των διαλυτών και τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους. Από την ανάλυση προέκυψε ότι μια φιάλη κρασί (750 ml) ποικιλίας ξινόμαυρου περιέχει 3.88 gφαινολικού φορτίου που αντιστοιχεί σε 0.51% απόδοση φαινολών (ανά 100 ml οίνου).

Η δόση χορήγησης καθορίστηκε στα 25mg πολυφαινολών ανά kg σωματικού βάρους. Εφόσον το εκχύλισμα είναι 26.7% πολυφαινολικό απαιτούνται 34.5mg εκχυλίσματος ανα επίμυ την ημέρα. Για τον υπολογισμό των δόσεων χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή του σωματικού βάρους των επίμυων κατά την έναρξη του πειραματισμού. Ακολούθησε παρασκευή των δόσεων με διάλυση

34.5mg εκχυλίσματος σε 1.5ml απεσταγμένου νερού και καθημερινή χορήγηση στο πόσιμο νερό που καταναλώνονταν από τους επίμυες. Για την ομάδα ελέγχου παρασκευάστηκαν αντίστοιχα δόσεις με 1.5 ml απεσταγμένου νερού.

3.1.3 Χορήγηση προβλεπόμενης δόσης

Το εκχύλισμα χορηγείτο καθημερινά, την ίδια ώρα, για 14 ημέρες, μαζί με το πόσιμο νερό των επιμύων. Στην ομάδα ελέγχου (control) χορηγούνταν 1,5 mL απεσταγμένου νερού μαζί με το πόσιμο νερό. Ενώ στην άλλη ομάδα (test) χορηγούνταν 1.5 mL διαλύματος απεσταγμένου νερού κι εκχυλίσματος μαζί με το πόσιμο νερό.

3.1.4 Κλινική εξέταση

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης πραγματοποιούνταν κλινικοί έλεγχοι. Μεταξύ αυτών η καταγραφή του σωματικού βάρους την 1^η ημέρα της χορήγησης, την 7^η ημέρα και την ημέρα της ευθανασίας. Η κατανάλωση τροφής και νερού καταγράφονταν καθημερινά. Ο ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ του τελικού και του αρχικού βάρους διαιρούμενο με τις ημέρες χορήγησης. Οι καθημερινοί κλινικοί έλεγχοι συμπεριλάμβαναν την εμφάνιση συμπτωμάτων στο δέρμα, στους οφθαλμούς, στο αναπνευστικό, ουρογεννητικό, πεπτικό, νευρικό, καρδιαγγειακό και μυοσκελετικό σύστημα. Επιπλέον έλεγχος για θνησιμότητα ή θνητότητα πραγματοποιούνταν καθημερινά, 12 ώρες μετά τη χορήγηση.

3.1.5 Νευρολογική εξέταση

Την 1^η ημέρα, την 7^η και την 14^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νευρολογική εξέταση. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκαν αλλαγές στη συμπεριφορά των επιμύων εντός κι εκτός κλουβιών, μεταβολές στη στάση του σώματος, τη βάδιση, τα αντανακλαστικά κτλ.

3.1.6 Νεκροτομή

Στο τέλος της μελέτης, οι επίμυες ήταν σε κατάσταση νηστείας για μια νύχτα και αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο. Κριτήριο για το βάθος της αναισθησίας ήταν η μύση της

κόρης του οφθαλμού και, επικουρικά, ο έλεγχος του αντανακλαστικού του βλεφάρου και της απόσυρσης του άκρου ποδός μετά από νύξη. Έπειτα ακολούθησε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας και συλλογή αίματος με καρδιακή παρακέντηση από την δεξιά κοιλία (1 mL σε φιαλίδιο αιμοληψίας με EDTA για αιματολογική εξέταση και 2 mL σε φιαλίδιο με ηπαρίνη για βιοχημικές). Το αίμα που συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά, ο ορός απομακρύνθηκε αμέσως και φυλάχθηκε στο ψυγείο. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία εντός 4-6 ωρών στο εργαστήριο προπαιδευτικής της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ.

Μετά την αιμοληψία, υπό την επίρεια του ισοφλουρανίου, ακολούθησε απεξάρθρωση του πρώτου αυχενικού σπονδύλου προκειμένου να επέλθει ο θάνατος. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής νεκροψία, συμπεριλαμβανομένης της προσεκτικής εξέτασης του σώματος (δέρμα, τρίχωμα, βλεννογόνοι), της στοματικής και ρινικής κοιλότητας, του πρωκτού, των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, της κρανιακής, θωρακικής, κοιλιακής κοιλότητας και των εσωτερικών οργάνων. Για τους σκοπούς της μελέτης συλλέχθηκαν οι παρακάτω ιστοί: εγκέφαλος, μάτια, πνεύμονες, καρδιά, ήπαρ, στόμαχος, πάγκρεας, σπλήνα, νεφροί, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, όρχεις και τετρακέφαλο μύ. Έπειτα αξιολογήθηκαν όλα τα όργανα ως προς το μέγεθος, το χρώμα, την υφή και τη σύσταση, ενώ παράλληλα τα κοίλα όργανα και οι κοιλότητες αξιολογήθηκαν κι ως προς το περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα της νεκροτομικής εξέτασης καταγράφηκαν σε πίνακα, όπως φαίνεται στο Παράρτημα III.

3.1.7 Στατιστική

Για τα ποσοτικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε το Kolmogorov-Smirnov test, για να ελεγχθεί αν οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή και το Levene Median test, για τον έλεγχο της διασποράς. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής, τα δεδομένα αναλύονταν με το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ANOVA. Για τις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το Chi-Square (χ^2 test) και το Fisher's exact test, καθώς οι συχνότητες εμφάνισης ήταν <5 . Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS (IBM) έκδοση: 26.0. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε μικρότερο από 0.05 ($p < 0,05$).

3.2 Πειραματικά Πρωτόκολλα

3.2.1 Διαχωρισμός ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (RBCL) και πλάσματος

Αντιδραστήρια:

- Απιονισμένο νερό

- Σωληνάρια με 200μL EDTA

Πειραματική Διαδικασία:

Συλλέγουμε το αίμα σε σωληνάρια με 200μL EDTA 7.5% και το ανακινούμε μερικές φορές. Έπειτα φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4°C και συλλέγουμε το υπερκείμενο, δηλαδή το πλάσμα, σε φιαλίδια erpendorf. Στο ίζημα, δηλαδή στα ερυθροκύτταρα, προσθέτουμε απιονισμένο νερό (dH₂O) 1:1 v/v και ανακινούμε βίαια. Ακολούθως φυγοκεντρούμε στα 4000 g, για 15 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα, στο οποίο συσσωρεύονται μεμβράνες των ερυθροκυττάρων πολύ μικρού όγκου (10-20μL), απορρίπτεται ενώ το υπερκείμενο, δηλαδή το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (red blood cell lysate-RBCL) συλλέγεται σε φιαλίδια erpendorf. Η διατήρηση τους γίνεται στους -80°C.

3.2.2 Υπολογισμός αιμοσφαιρίνης

Ο υπολογισμός της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Red Blood Cell Lysate-RBCL) γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του hemiglobincyanide (HiCN) χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit Dutch Diagnostics, Zutphen, Holland.

Αντιδραστήρια:

- R1 (pH 7.3):

Για την παρασκευή του διαλύματος R1 προστίθενται 0.60mmol/L Potassium ferricyanide, 0.90mmol/L Potassium cyanide και 2mmol/L Dihydrogen potassium phosphate.

Πειραματική Διαδικασία:

Σε erpendorf προσθέτουμε 5μL δείγματος RBCL, 1mL διαλύματος R1 και αναδεύουμε με vortex. Σε ένα δεύτερο erpendorf προσθέτουμε μόνο 1ml διαλύματος R1 ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Blank και αναδεύουμε με vortex. Έπειτα επωάζουμε στο σκοτάδι για 10 λεπτά και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 540nm με πλαστική κυψελίδα.

3.2.3 Επεξεργασία ιστών

Για την εκτέλεση των πειραματικών μεθόδων χρειάστηκε να γίνει ομογενοποίηση των διαφόρων ιστών.

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα PBS με αναστολείς πρωτεασών

Για την παρασκευή 10mL προστίθενται 700μL PBS, 100μL EDTA, 100μL PMSF και 100mL απροτινίνη. Το διάλυμα παρασκευάζεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

Πειραματική Διαδικασία:

Κόβουμε τον ιστό με νυστέρι, τον ζυγίζουμε ώστε να έχει βάρος περίπου 200mg και τον μεταφέρουμε σε ειδικά tubes. Έπειτα προσθέτουμε το διάλυμα PBS με αναστολείς πρωτεασών σε αναλογία ιστός:PBS 1:4 και ομογενοποιούμε στον ομογενοποιητή Minilys της Bertin Instruments για 30 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα. Αμέσως μετά φυγοκεντρούμε στα 15 000 g στους 5°C για 5 λεπτά. Τέλος συλλέγουμε το υπερκείμενο σε ξεχωριστά κλάσματα (aliquot) και τα διατηρούμε στους -80°C ενώ το ίζημα απορρίπτεται. Τα κλάσματα αποψύχονται μόνο μία φορά πριν την ανάλυση και δεν επαναχρησιμοποιούνται.

3.2.4 Υπολογισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε ιστούς με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο Bradford

Για την παρασκευή 1L ζυγίζονται 100mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue και προστίθενται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως επενδυμένο με αλουμινόχαρτο. Στη συνέχεια, προστίθενται 50mL 95% (v/v) αιθανόλης και 100mL 85% (w/v) φωσφορικού οξέος. Το διάλυμα αναδύεται με μαγνήτη μέχρι να διαλυθεί πλήρως η σκόνη. Έπειτα, ογκομετρείται μέχρι το 1L με dH₂O, αναδύεται με μαγνήτη και φιλτράρεται. Ακολουθεί μια σειρά φωτομετρήσεων στα 595nm προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη της αλβουμίνης, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

Πειραματική Διαδικασία:

Σε σωληνάκια τύπου erpendorf προσθέτουμε 20μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS και 1mL αντιδραστήριο Bradford. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι erpendorf προσθέτουμε 20μL PBS και 1mL αντιδραστήριο Bradford ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Blank. Έπειτα αναδεύουμε όλα τα erpendorfs με vortex και τα αφήνουμε για επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 595nm με πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί:

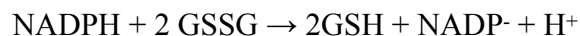
Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford. Ειδικότερα, η ποσότητα της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης υπολογίζεται με βάση τους συντελεστές (α,β), που προκύπτουν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης σε mg/mL, η οποία είναι της μορφής $y = ax + b$.

3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη συνδεδεμένα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη θειόλη στους ζωντανούς οργανισμούς με αναγωγική δράση, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών, στην φυσιολογική λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, στην αναγωγή υδροϋπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών. Επίσης λαμβάνει μέρος στις διαδικασίες μεταβολισμού φαρμάκων, ασβεστίου, στον κύκλο του γλουταμινικού οξέος, στη διατήρηση των επιπέδων των -SH των πρωτεϊνών κτλ. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (GSH) εφ'όσον το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αντίδραση αναγωγής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) προς την ανηγμένη, όπως φαίνεται παρακάτω:

GR



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 6: Αναγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης

Πέρα από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), η γλουταθειόνη αποτελεί υπόστρωμα πολλών άλλων ενζύμων όπως της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της θειλοτρανσφεράσης (TTase).

Αντιδραστήρια:

- TCA 5%
- Διάλυμα κιτρικού νατρίου με DTNB (MB: 294.10)

Αρχικά παρασκευάζεται 1% κιτρικό νάτριο διαλύοντας 1g κιτρικού νατρίου σε 100ml dH₂O. Έπειτα προστίθενται 0.0396g DTNB.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67mM, pH 7.95)

Πειραματική Διαδικασία:

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης προαπαιτείται προετοιμασία του δείγματος. Σε σωληνάκια τύπου erpendorf προσθέτουμε 50μL ομογενοποιημένου ιστού και 50μL TCA 5%. Έπειτα κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 1500g για 5 λεπτά στους 5°C. Τέλος μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάκια τύπου erpendorf ενώ το ίζημα απορρίπτεται.

Για την διαδικασία υπολογισμού της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης κάνουμε αραιώση 1:2 ιστού με PBS και μεταφέρουμε 20μL από το αραιωμένο δείγμα σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf. Για τα δείγματα αιμολύματος μεταφέρουμε 20μL από το αρχικό δείγμα σε σωληνάκι τύπου erpendorf. Ακολούθως προσθέτουμε 330μL διαλύματος κιτρικού νατρίου με DTNB και 660μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι erpendorf προσθέτουμε 660μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 330μL διάλυμα κιτρικού νατρίου με DTNB και 20μL PBS ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Blank. Στη συνέχεια κάνουμε vortex όλα τα σωληνάκια και επωάζουμε στο

σκοτάδι για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 412nm με γυάλινη κυψελίδα. Οι φυσιολογικές τιμές συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής GSH κυμαίνονται από 1 έως 10mM.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο αιμόλυμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστικότητα συγκέντρωσης της GSH (mmol/ g Hb)} = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta A_{\text{τυφλού}} / 13,6) \times 262,6 \times 2 \times 2 \times 1,3 / \text{g Hb}$$

Το 262,6 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται με 2 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων και με 2 x 1,3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500μL αιμόλυμα / 500μL TCA 5%) και τη δεύτερη αραίωση (390μL αιμόλυμα / 300μL TCA 5%) που έγινε με TCA 5%. Το 13,6 (L/mmol/cm) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10 x 2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στους ιστούς γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστικότητα συγκέντρωσης της GSH (}\mu\text{mol/mg)} = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta A_{\text{τυφλού}} / 13,6) \times 2 \times 4 \times 50,5 / \text{mg πρωτεΐνης}$$

Το 13,6 (L/mmol/cm) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB και το 50,5 είναι ο συντελεστής αραίωσης (DF), ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του δείγματος (20μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 4 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση με PBS κατά την ομογενοποίηση, επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση που έγινε με TCA 5% και επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση του δείγματος στη μέθοδο. Κατόπιν, με τη μέθοδο Bradford, λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζεται αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

3.2.6 Υπολογισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν συστατικά των οργανισμών κι έχουν την δυνατότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των κυτταρικών συστατικών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε αντιοξειδωτικό συμβάλλει διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Αρχή της μεθόδου:

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ιστού αξιολογείται χρησιμοποιώντας το 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) το οποίο είναι μια εμπορική ελεύθερη ρίζα. Παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού μορίου στο δείγμα ιστού και αίματος, η ελεύθερη ρίζα DPPH• ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη και ανιχνεύεται φασμαροφωτομετρικά με τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 520nm σε σύγκριση με το Blank.

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10mM, pH 7.4)

Για την παρασκευή 500mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτούνται 100mL KH_2PO_4 (10mM) και 400mL Na_2HPO_4 (10mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζονται 0,136g και διαλύονται σε 100mL H_2O . Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίζονται 0,712g και διαλύονται σε 400mL H_2O . Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα και διορθώνεται το pH μέχρι 7.4.

- DPPH (0.1mM, MB: 394.32g/mol)

Σε 5mL μεθανόλης αναμειγνύονται 0,02g DPPH ώστε η συγκέντρωση να είναι 10mM. Στη συνέχεια το διάλυμα αραιώνεται 100 φορές με μεθανόλη και αναμειγνύεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,1mM. Ουσιαστικά, 200μL διαλύματος 10mM DPPH αραιώνονται σε 19,8mL μεθανόλης. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Πειραματική Διαδικασία:

Για τον προσδιορισμό της TAC στους ιστούς προσθέτουμε σε σωληνάκια τύπου erpendorf 460μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 500μL DPPH και 40μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS. Για τον προσδιορισμό της TAC στο αιμόλυμα προσθέτουμε σε σωληνάκια τύπου erpendorf 480μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 500μL DPPH και 20μL RBCL. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι erpendorf προσθέτουμε 500μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και 500μL DPPH ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Blank. Έπειτα αναδεύουμε όλα τα erpendorfs με vortex και τα αφήνουμε για επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου φυγοκεντρούμε στα 15 000g για 3 λεπτά στους 25°C. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 520nm.

Υπολογισμοί:

Τα αποτελέσματα για το αιμόλυμα εκφράζονται ως:

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

$$\mu\text{mol ανηγμένου DPPH} / \text{mL δείγματος} = [(\% \text{Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000 / \text{g Hb}$$

Η διαίρεση με 100 γίνεται ώστε να μετατραπεί η μείωση της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης και πολλαπλασιάζεται με 50 για να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα. Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 50 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση του δείγματος στην κυψελίδα. Τέλος διαιρείται με 1000 ώστε να μετατραπούν τα L του δείγματος σε ml και με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης που υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit.

Τα αποτελέσματα για τους ιστούς εκφράζονται ως:

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

$$\mu\text{mol ανηγμένου DPPH} / \text{mL δείγματος} = [(\% \text{Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 4 \times 10] / 1000 / \text{mg πρωτεΐνης}$$

Η διαίρεση με 100 γίνεται ώστε να μετατραπεί η μείωση της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης και πολλαπλασιάζεται με 50 για να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα. Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 25 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση του ιστού στην κυψελίδα, επί 4 για να ληφθεί υπόψη η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του δείγματος και επί 10 για την αραίωση του ιστού κατά τη μέθοδο. Τέλος διαιρείται με 1000 ώστε να μετατραπούν τα L του δείγματος σε ml. Κατόπιν, με τη μέθοδο Bradford, λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζεται αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

3.2.7 Προσδιορισμός των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν τα λιπαρά αυτά οξέα προκαλώντας την οξειδωση τους και την παραγωγή αντιδραστικών ενδιάμεσων όπως τη μηλονική διαλδεύδη (MDA), η οποία αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος ελέγχου και παρακολούθησης της λιπιδικής υπεροξειδωσης, βασίζεται στην αντίδραση της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Η μηλονική διαλδεύδη σχηματίζει ένα σύμπλοκο 1:2 με το θειοβαρβιτουρικό οξύ [MDA(TBA)₂], το οποίο μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 530nm.

Αντιδραστήρια:

- Tris-HCl (200mM, pH 7.4)

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος Tris-HCl απαιτείται η παρασκευή 25mL Tris (200mM) και 42mL HCl (0.1N). Για το διάλυμα Tris ζυγίζονται 0,61g και διαλύονται σε 25mL H₂O. Για το διάλυμα HCl αιραινώνονται 0,42mL από το απόθεμα 37% με dH₂O μέχρι τον όγκο των 42mL. Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα, προστίθεται dH₂O μέχρι τον όγκο των 100mL και διορθώνεται το pH μέχρι 7.4.

- Διάλυμα Na₂SO₄ - TBA (55mM)

Για την παρασκευή 10mL διαλύματος ζυγίζονται 2,84g Na₂SO₄ και 0,08g TBA. Στη συνέχεια αναμειγνύονται, προστίθονται 10mL dH₂O και αφήνεται για ανάδευση υπό θέρμανση μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- TCA 100%

Το TCA είναι ένα αντιδραστήριο το οποίο απορροφά υγρασία από τον αέρα, για το λόγο αυτό διαλύεται σε dH₂O. Για την παρασκευή 1L TCA 100% αναμυγνίεται 1kg σκόνης TCA με ένα μικρό όγκο dH₂O εξαιτίας της ικανότητας του TCA να αυξάνει τον όγκο του νερού. Έπειτα το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ογκομετρείται μέχρι το 1L με dH₂O.

- TCA 70%

Για την παρασκευή 100mL διαλύματος TCA 70% αραιώνονται 70mL TCA 100% σε 30mL dH₂O.

- TCA 35%

Για την παρασκευή 100mL διαλύματος TCA 35% αραιώνονται 35mL TCA 100% σε 65mL dH₂O.

Πειραματική Διαδικασία:

Σε σωλήνα falcon προσθέτουμε 50μL RBCL ή 50μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS και σε έναν δεύτερο σωλήνα 50μL PBS ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Blank. Έπειτα προσθέτουμε 500μL TCA 35% και 500μL Tris - HCL. Αναδεύουμε με vortex και αφήνουμε για επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου προσθέτουμε 1mL διαλύματος Na₂SO₄ - TBA και αφήνουμε για επώαση στους 95°C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια μεταφέρουμε τους σωλήνες σε πάγο για 5 λεπτά, προσθέτουμε 1mL TCA 70% και αναδεύουμε με vortex. Μεταφέρουμε 1mL από το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα σε ξεχωριστά eppendorfes και φυγοκεντρούμε στα 11200g για 3 λεπτά στους 25°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης μεταφέρουμε 900μL σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 530nm.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των TBARS γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση TBARS (}\mu\text{mol/mL)} = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{}\Delta\text{A}_{\text{τυφλού}}) \times 0,156 \times 62 \times 2 \times 2 \text{ ή } 4 / \text{g Hb ή mg πρωτεΐνης}$$

Το 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA και το 62 είναι ο συντελεστής αραιώσεως, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3100μL) με τον όγκο του δείγματος (50μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 2 ή 4 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων ή PBS κατά την ομογενοποίηση, αντίστοιχα. Στην περίπτωση προσδιορισμού στο αίμα, διαιρείται με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης, όπου υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit, ενώ στην περίπτωση προσδιορισμού στους ιστούς, διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.2.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Βιοχημικό υπόβαθρο:

Οι ελεύθερες ρίζες αναγνωρίζουν τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών προκαλώντας οξειδωτικές τροποποιήσεις. Έναν τύπο τροποποίησης των πρωτεϊνών αποτελεί η καρβονυλίωση η οποία είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία με τελικά προϊόντα τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Μερικά αμινοξέα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε οξειδωτικές βλάβες όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, ιστιδίνη κτλ. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν μεταβολίζονται στα πρωτεασώματα και στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στον οργανισμό πρωτεΐνες οι οποίες έχουν χάσει την λειτουργία ή /και τη διαμόρφωση τους δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους με ικανότητα αναστολής της λειτουργίας του πρωτεασώματος. Τα συσσωματώματα αυτά είναι χημικά σταθερά και αποτελούν δείκτη σοβαρής οξειδωτικής βλάβης και βιοδείκτη οξειδωτικού στρες.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος ελέγχου και παρακολούθησης της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης βασίζεται στην σύνδεση της 2,4 - δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH) με καρβονυλιωμένα κατάλοιπα πρωτεϊνών και τη μετατροπή της σε 2,4 - δινιτροφαινύλιο (DNP), ένα σταθερό προϊόν υδραζόνης το οποίο απορροφά στα 375nm.

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα HCl (2.5N)

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος HCl 2.5N προστίθενται αργά 24,6mL αποθέματος HCl 37% σε 70mL dH₂O. Το διάλυμα ογκομετρείται μέχρι τα 100mL με dH₂O.

- DNPH (14mM)

Για την παρασκευή 100mL διαλύματος DNPH 14mM ζυγίζονται 0,2833g DNPH και προστίθενται 100mL HCl 2,5N. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Ουρία (5M, pH 2.3)

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος ουρίας 5M ζυγίζονται 30g ουρίας και προστίθενται 70mL dH₂O. Το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση υπό θέρμανση, ογκομετρείται μέχρι τα 100mL με dH₂O και ρυθμίζεται το pH στο 2,3.

- TCA 100%

Το TCA είναι ένα αντιδραστήριο το οποίο απορροφά υγρασία από τον αέρα, για το λόγο αυτό διαλύεται σε dH₂O. Για την παρασκευή 1L TCA 100% αναμυγνίζεται 1kg σκόνης TCA με ένα μικρό όγκο dH₂O εξαιτίας της ικανότητας του TCA να αυξάνει τον όγκο του νερού. Έπειτα το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ογκομετρείται μέχρι το 1L με dH₂O.

- TCA 10%

Για την παρασκευή 100mL διαλύματος TCA 10% αραιώνονται 10mL TCA 100% σε 90mL dH₂O.

- TCA 20%

Για την παρασκευή 100mL διαλύματος TCA 20% αραιώνονται 20mL TCA 100% σε 80mL dH₂O.

- Αιθανόλη
- Οξικός αιθυλεστέρας

Πειραματική Διαδικασία:

Σε σωληνάκια erpendorf προσθέτουμε 50μL RBCL ή 50μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS και 50μL TCA 20%. Έπειτα αναδεύουμε με vortex και αφήνουμε για επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα διατηρείται. Στο ίζημα προσθέτουμε 0,5mL DNPH για το δείγμα ενώ στο τυφλό 0,5mL HCl. Ακολουθώντας διαλύουμε χειροκίνητα χρησιμοποιώντας την άκρη της πιπέτας, αναδεύουμε με vortex και αφήνουμε για επώαση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 λεπτά. Αφού περάσει ο χρόνος, φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα διατηρείται. Αμέσως μετά προσθέτουμε 1mL TCA 10%, διαλύουμε χειροκίνητα με την άκρη της πιπέτας, κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Έπειτα προσθέτουμε 0,5mL αιθανόλης, 0,5mL οξικού αιθυλεστέρα, αναδεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα διατηρείται. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές. Την τελευταία φορά αφού αφαιρέσουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1mL ουρίας, κάνουμε vortex και επωάζουμε στον κλίβανο, στους 37°C για 15 λεπτά. Τέλος φυγοκεντρούμε τα erpendorfs στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C, μεταφέρουμε 900mL σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 375nm.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο αιμόλυμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (}\mu\text{mol/mL)} = \text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta A_{\text{τυφλού}} / 0,022 \times 20 \times 2 / \text{g Hb}$$

Το 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH και το 20 είναι ο συντελεστής αραιώσεως, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (50μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων. Τέλος διαιρείται με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης, όπου υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους ιστούς γίνεται με βάση τον τύπο:

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{A}_{\text{τυφλού}} / 0,022 \times 20 \times 2 \times 4 / \text{mg}$
πρωτεΐνης

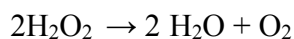
Το 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ και το 20 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000 μL) με τον όγκο του δείγματος (50 μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 4 για την αραιώση του δείγματος με PBS κατά την ομογενοποίηση. Τέλος διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.2.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Η καταλάση (CAT) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα με αυξημένες συγκεντρώσεις στα ερυθροκύτταρα και στο ήπαρ. Ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα και στα υπεροξειδιοσώματα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 , εμποδίζοντας το μετασχηματισμό του σε ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet) όπως φαίνεται παρακάτω:

CAT



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 7: Διάσπαση H_2O_2 από το ένζυμο καταλάση

Εξαιτίας της δράσης αυτής της καταλάσης, τα ερυθροκύτταρα προστατεύονται άμεσα από την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης καθώς και όλοι οι ιστοί αφού το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες ικανό να προκαλέσει βλάβες.

Αρχή της μεθόδου:

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου δηλαδή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η διάσπαση σε 2 H_2O και O_2 παρακολουθείται μέσω μείωσης της οπτικής απορρόφησης στα 240nm.

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67mM, pH 7.4)

Για την παρασκευή 500 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτούνται 100mL KH_2PO_4 (67mM) και 400mL Na_2HPO_4 (67mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζονται 0,91g και διαλύονται σε 100mL H_2O . Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίζονται 4,77g και διαλύονται σε 400mL H_2O . Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα και διορθώνεται το pH μέχρι 7.4.

- 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Πειραματική Διαδικασία:

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης στους ιστούς προσθέτουμε σε σωλήνες 2955μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και 40μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης στο αίμα προσθέτουμε 2991μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και 4μL RBCL. Έπειτα κάνουμε vortex και επωάζουμε στον κλίβανο για 10 λεπτά. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο στην πλαστική κυψελίδα χαλαζία UV, προσθέτουμε 5μL 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανακινούμε με τη χρήση ταινίας parafilm και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 240nm στα 5 και στα 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης στο αίμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα καταλάσης (U / mg ολικής πρωτεΐνης)} = (\Delta\text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{g Hb}$$

Το 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ και πολλαπλασιάζεται με το 1000 για να μετατραπεί από mol/L σε μmol/mL. Το 750 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3000μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 10 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 2 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων. Κατόπιν διαιρείται με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης, όπου υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης στους ιστούς γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα καταλάσης (U / mg ολικής πρωτεΐνης)} = (\Delta\text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό} / 40) \times (75 \times 1000 \times 40 \times 4) / \text{mg πρωτεΐνης}$$

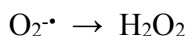
Το 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ και πολλαπλασιάζεται με το 1000 για να μετατραπεί από mol/L σε μmol/mL. Το 75 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL). Επίσης πολλαπλασιάζεται επί 40 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 4 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση με PBS κατά την ομογενοποίηση. Κατόπιν διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.2.10 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένα ένζυμο που παίζει ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα. Συγκεκριμένα, καταλύει τη μετατροπή της ρίζας του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σύμφωνα με την αντίδραση:

SOD



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 8: Σχηματισμός H_2O_2 από το ένζυμο σουπεροξειδική δισμουτάση

Αρχή της μεθόδου:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) βασίζεται στο ποσοστό αναστολής του NBT. Συγκεκριμένα για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης και το υπόστρωμα ξανθίνη προκειμένου να παραχθεί $O_2^{\bullet -}$. Επίσης προστίθεται NBT το οποίο ανταγωνίζεται την SOD για την εξουδετέρωση του $O_2^{\bullet -}$. Άρα το ποσοστό αναστολής του NBT αντανακλά την ποσότητα της SOD.

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.05M pH 7.8)

Για την παρασκευή 100mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτούνται 92mL KH_2PO_4 και 908mL K_2HPO_4 . Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζονται 0,68g και διαλύονται σε 100mL H_2O . Για το διάλυμα K_2HPO_4 ζυγίζονται 8,7g και διαλύονται σε 1000mL H_2O . Στη συνέχεια αναμειγνύονται 908mL K_2HPO_4 και 92mL KH_2PO_4 τα δύο διαλύματα και διορθώνεται το pH μέχρι 7,8.

- DETAPAC (1.34mM)

Ζυγίζονται 0,2653g και διαλύονται σε 500mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

- NBT (2.24mM)

Ζυγίζονται 0,1832g και διαλύονται σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Ξανθίνη

Ζυγίζονται 4,5mg και διαλύονται σε 25mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με ανάδευση υπό θέρμανση. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Οξειδάση της ξανθίνης

Εκτελείται μία ενδιάμεση αραίωση προκειμένου το stock ενζύμου 25U να φτάσει στα 60U. Άρα για τελικό όγκο 1mL προστίθενται 100μL ενζύμου και 900μL DETAPAC. Στη μέθοδο, για κάθε μία αντίδραση απαιτούνται 2,4μL οξειδάση της ξανθίνης και 97,6μL DETAPAC. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος. Διατηρείται σε πάγο.

- Buffer Master Mix

Για την παρασκευή 16mL προστίθενται 13,8mL DETAPAC, 0,5mL NBT και 1,7mL ξανθίνη. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος. Διατηρείται σε πάγο.

Πειραματική Διαδικασία:

Για το Blank ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

Σε σωληνάκι erppendorf προσθέτουμε 800μL Master Mix και 100μL DETAPAC. Αναδεύουμε με vortex, αδειάζουμε το περιεχόμενο σε κυψελίδα, την τοποθετούμε στο φωτόμετρο και μηδενίζουμε στα 560nm. Έπειτα προσθέτουμε 100μL οξειδάση της ξανθίνης, ανακινούμε και φωτομετρούμε στα 560nm για 90 δευτερόλεπτα.

Για το δείγμα ιστού ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

Σε σωληνάκι erppendorf προσθέτουμε 800μL Master Mix και 100μL RBCL αραιωμένου με νερό ή 100μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου με PBS. Αναδεύουμε με vortex, αδειάζουμε το περιεχόμενο σε κυψελίδα, προσθέτουμε 100μL οξειδάση της ξανθίνης, ανακινούμε και φωτομετρούμε στα 560nm για 90 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα σουπεροξειδικής δισμουτάσης} = 100\% - \% \text{ αναστολή του NBT}$$

Η διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος ανά λεπτό υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η διαφορά απορρόφησης του τυφλού ανά λεπτό υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η %αναστολή του NBT υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

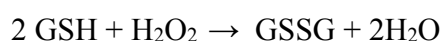
$$\% \text{ αναστολή του NBT} = (\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} - \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό}) / \Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \times 100 / \text{g Hb ή mg πρωτεΐνης}$$

3.2.11 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

Η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα τετραμερές ένζυμο με σελινοκυστεΐνη στο ενεργό του κέντρο, το οποίο συμβάλλει στην αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών. Συγκεκριμένα καταστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση μέσω μείωσης της συγκέντρωσης των λιπιδικών υπεροξειδίων. Βιοχημικά αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό (H₂O) με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH) σύμφωνα με την αντίδραση:

GPx



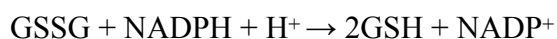
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 9: Οξείδωση ανηγμένης γλουταθειόνης από το ένζυμο περοξειδάση της γλουταθειόνης

Το κατάλοιπο σελινοκυστεΐνης του ενζύμου συμμετέχει άμεσα προσδίδοντας ένα ηλεκτρόνιο στο H_2O_2 ενώ η γλουταθειόνη (GSH) δρα ως δότης υδρογόνου ώστε να αναγεννηθεί η σελινοκυστεΐνη και το ένζυμο να μπορέσει να δράσει ξανά. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει επίσης την μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O . Όταν τα επίπεδα του H_2O_2 είναι φυσιολογικά ή χαμηλά τότε αναλαμβάνει δράση η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Ενώ όταν τα επίπεδα του H_2O_2 είναι υψηλά τότε αναλαμβάνει το ένζυμο καταλάση.

Αρχή της μεθόδου:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) βασίζεται στην οξείδωση του NADPH. Συγκεκριμένα κατά τη δράση του ενζύμου GPx η γλουταθειόνη ανάγεται και μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Έπειτα το ένζυμο αναγωγάζει της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH, ώστε να μπορέσει να επαναχρησιμοποιηθεί, με ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH σύμφωνα με την αντίδραση:

GR



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 10: Αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης από το ένζυμο περοξειδάση της γλουταθειόνης

Το $NADP^+$ που παράγεται προσδιορίζεται φωτομετρικά με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 340nm.

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100mM, pH 7)

Για την παρασκευή 500mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτούνται 250mL KH_2PO_4 και 250mL K_2HPO_4 . Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζονται 6,8g και διαλύονται σε 250mL H_2O . Για το διάλυμα K_2HPO_4 ζυγίζονται 8,7g και διαλύονται σε 250mL H_2O . Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα, προστίθενται 186mg di-sodium EDTA 1mM και διορθώνεται το pH μέχρι 7.

- Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH 10mM)

Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης 10mM ζυγίζονται 31g GSH και προστίθενται 10mL dH_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- NADPH (1.5mM)

Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος NADPH 1.5mM ζυγίζονται 11,2mg NADPH, 10mg $NaHCO_3$ 0.1% και προστίθενται 10mL dH_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Αναγωγάζει της γλουταθειόνης (GR)

Για την παρασκευή 2.4U/mL GR διαλύονται 10μL από το εμπορικό stock (500U, 5mg/mL, 120U/mg protein) σε 4990μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

- tert-Butyl hydroperoxide (t-BuOOH 12mM)

Διαλύονται 5μL t-BuOOH 6M σε 4990μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

Πειραματική Διαδικασία:

Σε σωληνάκι erpendorf προσθέτουμε 500μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 100μL RBCL αιραιωμένο με νερό ή 100μL ομογενοποιημένου ιστού αιραιωμένου με PBS, 100μL GR και 100μL GSH. Αφήνουμε για επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου προσθέτουμε 100μL NADPH και αφήνουμε για επώαση ακόμη 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε κυψελίδα, προσθέτουμε 100μL t-BuOOH, ανακινούμε και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 340nm για 150 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (U/g ολικής πρωτεΐνης ή g Hb)} = 0,868 \times \frac{\Delta \text{Abs}_{\text{NADPH}}}{10 \times 10 \times 100 \times 2 \text{ ή } 4} / \text{g Hb ή mg ολικής πρωτεΐνης}$$

Το 0,868 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH και το 10 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL). Επίσης διαιρείται δια 10 για να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση της γλουταθειόνης, πολλαπλασιάζεται επί 100 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 2 ή 4 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων ή με PBS κατά την ομογενοποίηση, αντίστοιχα. Στην περίπτωση προσδιορισμού στο αίμα, διαιρείται με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης, όπου υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit, ενώ στην περίπτωση προσδιορισμού στους ιστούς, διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.2.12 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Βιοχημικό Υπόβαθρο:

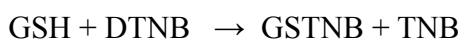
Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) είναι ένα ένζυμο απαραίτητο για αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Συγκεκριμένα καταλύει την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην οξειδωμένη της μορφή (GSH), με τη χρήση ενός μορίου NADPH. Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης, το ένζυμο αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών, δρα ως συμπαραγοντας διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων και συμμετέχει στη μεταφορά διαφόρων αντιοξειδωτικών όπως βιταμίνη E στη θέση δράσης τους αλλά και στην αναγέννηση τους.

Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης του οξειδωτικού στρες, με τα κύτταρα να ρυθμίζουν τα επίπεδα της GSH, παραμένοντας υψηλά, ενώ της GSSG χαμηλά. Το λόγο αυτό ρυθμίζει το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

Αρχή της μεθόδου:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) βασίζεται στην αναγωγή του 2-νιτροβενζοϊκού οξέος (DNTB). Συγκεκριμένα κατά τη δράση της GR η GSSG ανάγεται σε 2 μόρια GSH, με ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH. Έπειτα η GSH αντιδρά με το DTNB σχηματίζοντας GSTNB και TNB, σύμφωνα με την αντίδραση:

GR



ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ 11: Αντίδραση ανηγμένης γλουταθειόνης με το 2-νιτροβενζοϊκό οξύ

Το TNB που παράγεται προσδιορίζεται φωτομετρικά με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412nm.

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (200mM, pH 7.5)

Για την παρασκευή 500mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών απαιτούνται 250mL KH_2PO_4 και 250mL K_2HPO_4 . Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζονται 13,6g και διαλύονται σε 250mL H_2O . Για το διάλυμα K_2HPO_4 ζυγίζονται 17,4g και διαλύονται σε 250mL H_2O . Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα, προστίθενται 146mg di-sodium EDTA 1mM και διορθώνεται το pH μέχρι 7,8.

- DTNB (3mM)

Ζυγίζονται 11,9mg DTNB και διαλύονται σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- β-NADPH (2mM)

Για την παρασκευή 1 mL διαλύματος β-NADPH 2mM ζυγίζονται 1,49mg β-NADPH και διαλύονται σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG 20mM)

Για την παρασκευή 1 mL διαλύματος οξειδωμένης γλουταθειόνης 20mM ζυγίζονται 50g GSSG και προστίθεται 1mL dH_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

- Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Για την παρασκευή 1U/mL GR διαλύονται 5μL από το εμπορικό stock (500U, 5mg/mL, 120U/mg protein) σε 154,4μL dH_2O .

Πειραματική Διαδικασία:

Σε σωληνάκια erpendorfs προσθέτουμε 700μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 250μL DTNB και 50μL β-NADPH. Για το Blank ακολουθούμε της εξής διαδικασία:

Μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε πλαστική κυψελίδα, προσθέτουμε 50μL GSSG και μετράμε την τιμή της απορρόφησης στα 412nm. Έπειτα αφαιρούμε την κυψελίδα από το φωτόμετρο, προσθέτουμε 25μL GR, κάνουμε γρήγορη ανάδευση και μετράμε την πτική απορρόφηση στα 412nm για 30 δευτερόλεπτα.

Για το δείγμα ιστού ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

Μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε πλαστική κυψελίδα, προσθέτουμε 50μL GSSG και 25μL RBCL αιραιωμένο με νερό ή 25μL ομογενοποιημένου ιστού αιραιωμένου με PBS. Έπειτα κάνουμε γρήγορη ανάδευση και μετράμε την πτική απορρόφηση στα 412nm για 30 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (U/g Hb ή mg πρωτεΐνης)} = 0,868 \times \Delta\text{Abs}_{\text{δείγματος}} \times 0,026 / \Delta\text{Abs}_{\text{οτυφλού}} \times 40 \times 100 \times 2 \text{ ή } 4 / \text{g Hb ή mg ολικής πρωτεΐνης}$$

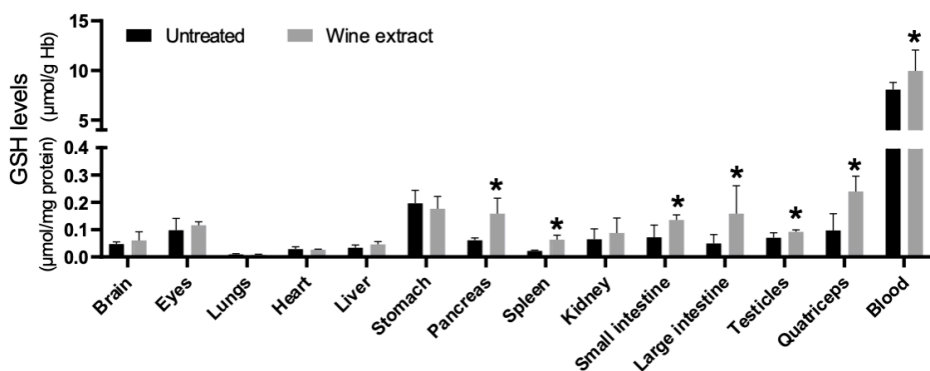
Το 0,868 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH και το 10 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL). Επίσης διαιρείται δια 10 για να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση της γλουταθειόνης, πολλαπλασιάζεται επί 100 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση του δείγματος στη μέθοδο και επί 2 ή 4 για να ληφθεί υπόψη η αραιώση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων ή PBS κατά την ομογενοποίηση, αντίστοιχα. Στην περίπτωση προσδιορισμού στο αίμα, διαιρείται με τα γραμμάρια της αιμοσφαιρίνης, όπου υπολογίζονται με τη βοήθεια ενός kit, ενώ στην περίπτωση προσδιορισμού στους ιστούς, διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διάρκεια χορήγησης εκχυλίσματος κρασιού για την ομάδα χορήγησης (wine extract) και απεσταγμένου νερού για την ομάδα ελέγχου (untreated) διήρκησε 14 ημέρες. Την τελευταία ημέρα έγινε συλλογή αίματος από τους επιμύες των δύο ομάδων και εξέταση οκτώ δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Τα αποτελέσματα στους δείκτες αίματος εκφράστηκαν σε $\mu\text{mol/g}$ αιμοσφαιρίνης (Hb). Έπειτα οι επιμύες θανατώθηκαν, δεκατρείς ιστοί τους απομονώθηκαν, εξετάστηκαν και τα αποτελέσματά τους εκφράστηκαν σε $\mu\text{mol/mg}$ πρωτεΐνης. Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα για κάθε δείκτη οξειδοαναγωγικής κατάστασης που εξετάστηκαν στην ομάδα ελέγχου (untreated) και στην ομάδα χορήγησης (wine extract).

4.1 Συγκέντρωση γλουταθειόνης

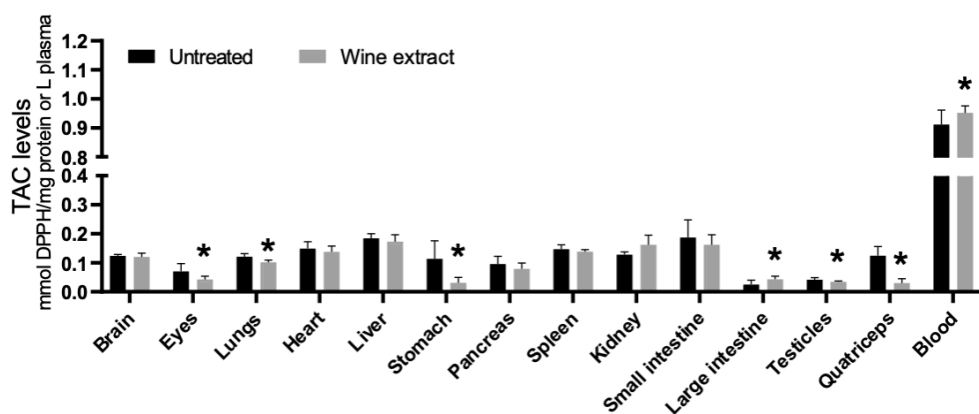
Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά των οργανισμών και εντοπίζεται σε δύο μορφές: την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG). Το μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή, ικανή να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Διαφορετικοί ιστοί έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα οποία υποδεικνύονται στο Διάγραμμα 5, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανηγμένης γλουταθειόνης φαίνεται να εντοπίζονται στο αίμα των επιμύων, με στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα χορήγησης, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους πνεύμονες. Στατιστικά σημαντική αύξηση έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς της ομάδας χορήγησης όπως στο πάγκρεας, στον σπλήνα, στους όρχεις, στον τετρακέφαλο μύη, στο λεπτό και στο παχύ έντερο. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν έχει σημειωθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: Συγκέντρωση γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

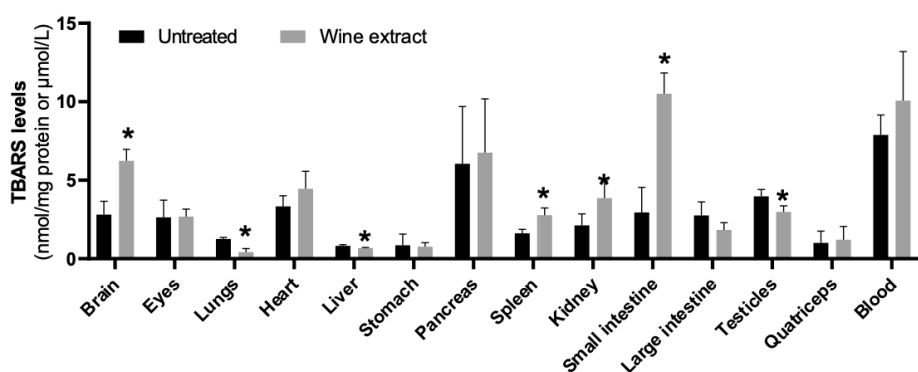
Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα διαφόρων κυτταρικών συστατικών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας το κρασί φαίνεται να επηρεάζει κυρίως αρνητικά τους περισσότερους ιστούς μειώνοντας την ολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα στατιστικά σημαντική μείωση της ικανότητας αυτής έχει παρατηρηθεί στα μάτια, στους πνεύμονες, στο στομάχι, στους όρχεις και στον τετρακέφαλο μυ των επιμύων της ομάδας χορήγησης. Αντίθετα στο αίμα και στο παχύ έντερο η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά για την ομάδα χορήγησης. Παρόλα αυτά η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται στο αίμα των επιμύων ενώ η χαμηλότερη στους όρχεις και στο παχύ έντερο. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν έχει σημειωθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες, όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 6.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ιστών και αίματος των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.3 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

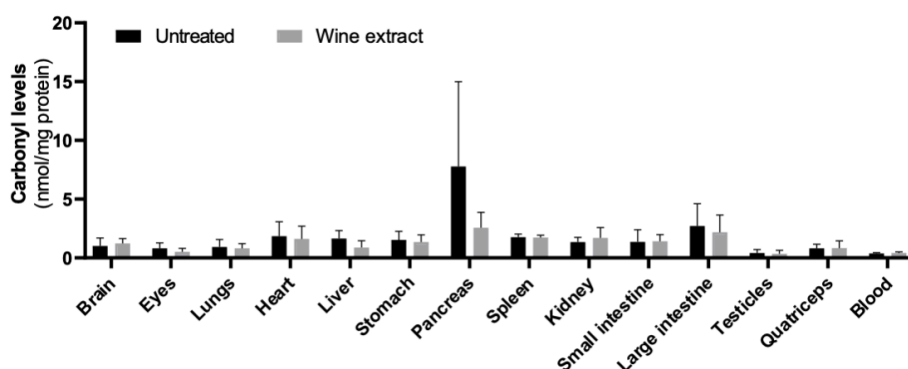
Τα επίπεδα των TBARS αποτελούν δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού φάνηκε να επηρεάζει αρκούς ιστούς, αυξάνοντας ή μειώνοντας την οξείδωση των λιπών, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στον εγκέφαλο, στον σπλήνα, στα νεφρά και κυρίως στο λεπτό έντερο, με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των δύο ομάδων. Ενώ σημαντική στατιστική μείωση παρατηρήθηκε στους πνεύμονες, στο ήπαρ και στους όρχεις της ομάδας χορήγησης. Επιπλέον αυξημένη βρέθηκε η συγκέντρωση των TBARS στο αίμα των δύο ομάδων χωρίς όμως κάποια στατιστική σημαντικότητα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με το TBAR σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.4 Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

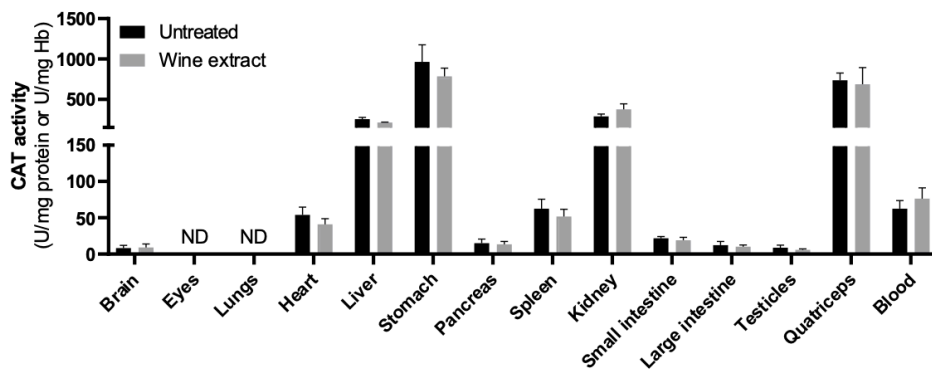
Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι προϊόντα οξειδωτικής τροποποίησης των ελευθέρων ριζών τα οποία δεν μεταβολίζονται και συσσωρεύονται στον οργανισμό ως ανεσταλμένες πρωτεΐνες ή /και συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά είναι χημικά σταθερά μόρια και αποτελούν δείκτη σοβαρής οξειδωτικής βλάβης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τα οποία υποδεικνύονται στο Διάγραμμα 8, το εκχύλισμα κρασιού φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς εκτός από το πάγκρεας στο οποίο η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκε, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η μεταβολή.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.5 Δραστικότητα καταλάσης (CAT)

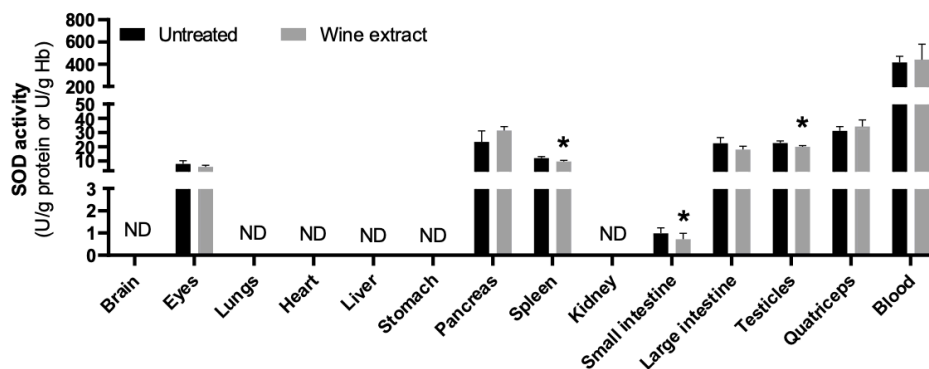
Η καταλάση (CAT) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως σε όργανα με αυξημένες ανάγκες αποτοξίνωσης όπως το ήπαρ, ο στομάχος, ο νεφρός και ο τετρακέφαλος μύς. Αν και τα επιπέδα του ενζύμου αυτού βρέθηκαν αυξημένα, σε κανέναν ιστό δεν έχει παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των δύο ομάδων, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9. Στα μάτια και στους πνεύμονες δεν έχει προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ενζύμου.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: Δραστικότητα ενζύμου καταλάσης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.6 Δραστικότητα σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ακόμη ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο φαίνεται να εντοπίζεται σε αρκετούς ιστούς όπως το πάγκρεας, τον σπλήνα, τους όρχεις, το αίμα, τον τετρακέφαλο μύ, τα μάτια, το παχύ και το λεπτό έντερο. Στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της SOD παρατηρήθηκε στο λεπτό έντερο, στους όρχεις

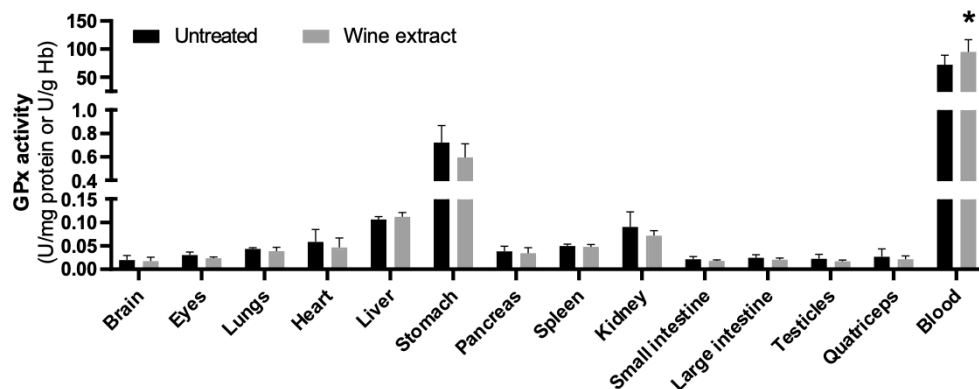


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Δραστικότητα ενζύμου σουπεροξειδικής δισμουτάσης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

και στον σπλήνα της ομάδας χορήγησης, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν έχει προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ενζύμου.

4.7 Δραστικότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

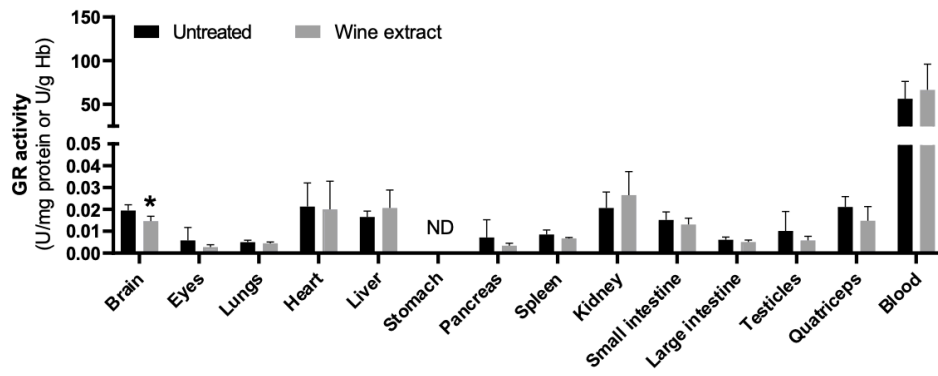
Η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο το οποίο συμβάλλει στην αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών, καταστέλλοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η συγκέντρωση του ενζύμου αυτού φαίνεται να είναι αυξημένη κυρίως στον στόμαχο και στο αίμα. Ωστόσο μόνο στον δεύτερο ιστό η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική για την ομάδα χορήγησης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύονται στο Διάγραμμα 11.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: Δραστικότητα ενζύμου περοξειδάση της γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

4.8 Δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) είναι ένα ακόμη ένζυμο απαραίτητο για την αντιοξειδωτική άμυνα των οργανισμών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο Διάγραμμα 12, σύμφωνα με το οποίο η συγκέντρωση της GR φαίνεται να είναι αυξημένη κυρίως στο αίμα και λιγότερο στα νεφρά, στην καρδιά, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Ωστόσο μόνο στον τελευταίο ιστό έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του ενζύμου για την ομάδα χορήγησης. Για τον στόμαχο δεν έχει προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ενζύμου.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ12: Δραστικότητα ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς και αίμα των ομάδων ελέγχου (untreated) και χορήγησης (wine extract)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες εκτενής βιβλιογραφία διερευνά το ρόλο διαφόρων αντιοξειδωτικών στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται έντονα στην αιτιολογία αρκετών χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών. Έρευνες σε φυσικά προϊόντα, συμπληρώματα, υποπροϊόντα του γεωργικού και αγροτοβιομηχανικού τομέα κτλ επιβεβαιώνουν την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος και διαφόρων ζωτικών οργάνων τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα, ενεργώντας προστατευτικά. [44] Ωστόσο οι πληροφορίες για μερικά αντιοξειδωτικά, όπως το κρασί, εξακολουθούν να είναι ανεπαρκείς αυξάνοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη. Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκαν διάφοροι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα και ιστούς αρουραίων έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού ποικιλίας ξινόμαυρου.

Η χορήγηση εκχυλίσματος ξινόμαυρου κρασιού φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα της γλουταθειόνης σε διάφορους ιστούς και στο αίμα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αίμα, στον τετρακέφαλο μύ, στους όρχεις, στον σπλήνα, στο πάγκρεας, στο λεπτό και στο παχύ έντερο της ομάδας χορήγησης. Στους υπόλοιπους ιστούς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή της GSH. Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν τις διαφορές στις προσαρμοστικές αποκρίσεις των ιστών σε αλλαγές του οξειδοαναγωγικού μεταβολισμού και μπορούν να συσχετιστούν με τη συνεισφορά πολλών κατηγοριών πολυφαινολών που εντοπίζονται στο κρασί και δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά συνεισφέροντας ευνοϊκά στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Για παράδειγμα η αυξημένη απορροφητική ικανότητα του εντέρου και η απελευθέρωση παγκρεατικών ενζύμων καθιστούν βιοπροσβάσιμες μεγάλες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων συμβάλλοντας στην αυξημένη συγκέντρωση γλουταθειόνης στο παχύ και λεπτό έντερο. [45, 46] Επιπλέον η αύξηση των επιπέδων της GSH πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητα των πολυφαινολών να ενισχύουν την ενζυμική δραστηριότητα ενζύμων υπεύθυνων για τη σύνθεση και δράση της πχ GCL, GSS, GPx, GST κτλ. Η έκφραση ή ενεργοποίηση των ενζύμων πραγματοποιείται σε ιστούς με χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης, ενώ μείωση έκφρασης, ή αναστολή πραγματοποιείται σε ιστούς με υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης. [47] Σύμφωνα με μία μελέτη που έγινε σε αρουραίους, αλλαγές που ανιχνεύονται σε διάφορους δείκτες αίματος αντανακλούν αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση αρκετών ιστών όπως σκελετικών μυών, καρδιάς και ήπατος. Ένας τέτοιος δείκτης αποτελεί η συγκέντρωση της GSH του αίματος η οποία μπορεί να περιγράψει επαρκώς την οξειδοαναγωγική κατάσταση των σκελετικών μυών και της καρδιάς. [44] Οι Kafantaris I. και συνεργάτες με σκοπό την μελέτη της ικανότητας των στερεών υπολειμμάτων των σταφυλιών να καταστέλλουν το οξειδωτικό στρες και να βελτιώνουν τη μικροχλωρίδα των κοπράνων αρνιών, βρήκαν αυξημένα τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα, στον σπλήνα και στον τετρακέφαλο μύ. [48] Μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Makti S. και συνεργάτες με

σκοπό τη μελέτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των αρνιών έπειτα από χορήγηση ζωοτροφής με βιοδραστικές ενώσεις λυμάτων ελαιολιβερίου, πλούσιας σε πολυφαινόλες, βρήκαν αυξημένα τα επίπεδα της GSH στην καρδιά, στους μύς, στον σπλήνα και στον εγκέφαλο μετά από 70 ημέρες, ενώ στο ήπαρ δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή. [49] Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται να συμφωνούν με τα ευρήματα των πιο πάνω ερευνών, επιβεβαιώνοντας τις μεταβολές των επιπέδων ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού μορίου, όπως αυτό της γλουταθειόνης, όπου προκαλεί το κρασί προκειμένου να επιτευχθεί οξειδοαναγωγική ισορροπία.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, το εκχύλισμα ξινόμαυρου κρασιού φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τους περισσότερους ιστούς μειώνοντας την ολική τους αντιοξειδωτική ικανότητα. Εξαιρεση αποτελεί το αίμα και το παχύ έντερο όπου φάνηκε να επηρεάζονται θετικά. Η ταυτόχρονη αύξηση της GSH στους ιστούς αυτούς και της TAC μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους. Σε μία έρευνα η χορήγηση ζωοτροφής με βιοδραστικές ενώσεις λυμάτων ελαιολιβερίου, πλούσιας σε πολυφαινόλες, σε αρνιά βρέθηκε να αυξάνει τα επίπεδα τόσο της GSH όσο και της TAC στο αίμα και στον εγκέφαλο των ζώων. [49] Ενώ σε μία άλλη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης ελαιόλαδου υψηλής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, που έγινε σε αρουραίους, τα επίπεδα της TAC βρέθηκαν μειωμένα στο κόλον, στον σπλήνα και στους νεφρούς με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της GSH στο ήπαρ και στον σπλήνα. [50] Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται να συμφωνούν εν μέρη με την πρώτη έρευνα ενώ δεν ανταποκρίνονται στα δεδομένα της δεύτερης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική χημική αλλά και ποσοτική σύσταση πολυφαινολών, οι οποίες είναι γνωστό ότι ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω διαφόρων μηχανισμών σε κάθε ιστό καθώς επίσης και στην διαφορετική συγκέντρωση μετάλλων, οργανικών οξέων, βιταμινών, αμινοξέων, πρωτεϊνών κτλ. [51, 52] Η μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε μερικούς ιστούς μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η ενίσχυση ορισμένων αντιοξειδωτικών μορίων προκάλεσε, ως αποτέλεσμα αντιστάθμισης, τη μείωση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων των οποίων πιθανώς να μην ανιχνεύονται με τη μέθοδο αυτή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ποσότητα μόνο των αναγωγικών κι όχι των οξειδωτικών μορίων, ενώ η κατάσταση οξειδοαναγωγικής κατάστασης βασίζεται και στα δύο. Επομένως ακόμη κι αν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός ιστού μειώνεται, η πρόκληση οξειδωτικού στρες δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένη.

Η χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού φάνηκε να επηρεάζει αρκετούς ιστούς, αυξάνοντας ή μειώνοντας την οξείδωση των λιπών. Ένας από αυτούς αποτελεί ο εγκέφαλος στον οποίο τα επίπεδα TBARS αυξήθηκαν σημαντικά. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα του ιστού σε ακόρεστα λίπη, ιδιαίτερα στις κυτταρικές μεμβράνες της λευκής ουσίας, στην υψηλή ενεργειακή του ζήτηση και στην ασθενή αντιοξειδωτική ικανότητα θέτοντας τον ιστό αυτό εύκολο στόχο των ελευθέρων ριζών. [53,54] Ένας άλλος ιστός που φάνηκε να επηρεάζεται αρνητικά έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού είναι το λεπτό έντερο. Το λεπτό έντερο βρίσκεται

στη διεπαφή μεταξύ ενός οργανισμού και του περιβάλλοντος του αυλού του καθιστώντας το επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικά του αυλού. [45] Σύμφωνα με έρευνες η αιθανόλη, η οποία αποτελεί συστατικό του κρασιού, προκαλεί βλάβες στο γαστρικό βλεννογόνο και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα TBARS. [55] Σε δύο ακόμη ιστούς έχουν βρεθεί στατιστικά σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα των TBARS έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού: στο νεφρό και στο σπλήνα. Ο νεφρός είναι ένα όργανο εξαιρετικά ευάλωτο σε βλάβες που προκαλούνται από ROS, πιθανόν λόγω της αφθονίας του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και της παρουσίας τοξικών μεταβολίτων όπου πρέπει να απομακρυνθούν από τον οργανισμό μέσω των ούρων. [56] Σε μία έρευνα του κέντρου επιστημών υγείας του κρατικού πανεπιστημίου της Λουιζιάνα, βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα των TBARS σε νεφρούς αρουραίων και μειωμένα διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως CAT, SOD, GSHPx έπειτα από χορήγηση αιθανόλης. [57] Σε μία άλλη έρευνα, η χορήγηση ζωοτροφής με βιοδραστικές ενώσεις υπολυμάτων ελαιουργείου, πλούσιας σε πολυφαινόλες, σε αρνιά βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα των TBARS στην καρδιά, στον σπλήνα, στο ήπαρ, στον εγκαίφαλο και στον τετρακέφαλο μύ. [50] Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία φαίνεται να συμφωνούν μερικώς με τις πιο πάνω μελέτες εφόσον η μέθοδος μέτρησης των επιπέδων TBARS δεν έχει αποδεκτή αναπαραγωγιμότητα εξαιτίας ορισμένων μειονεκτημάτων όπως είναι η παρεμβολή της χολερυθρίνης σε δείγματα αίματος, οι μεγάλοι χρόνοι αντίδρασης που μπορούν να οδηγήσουν σε αποκλίσεις, η αντίδραση του TBA με την MDA και συστατικά που πιθανόν να μην σχετίζονται με την λιπιδική υπεροξείδωση κτλ. [58] Επιπλέον, στην παρούσα εργασία, αυξημένη βρέθηκε η συγκέντρωση των TBARS στο αίμα των δύο ομάδων χωρίς όμως κάποια στατιστική σημαντικότητα.

Παρά την αρνητική επίδραση του κρασιού στους πιο πάνω ιστούς, τα αποτελέσματα μας έδειξαν να έχει κι ευεργετική δράση σε μερικούς άλλους ιστούς όπως τους πνεύμονες, το ήπαρ και τους όρχεις, όπου τα επίπεδα των TBARS μειώθηκαν. Ίδιες συνέπειες εμφανίστηκαν σε ήπαρ και πνεύμονες αρνιών έπειτα από χορήγηση υπολειμμάτων σταφυλιών σε μία έρευνα που διεξήχθη από τον Kafantaris I. και τους συνεργάτες. [51] Επιπλέον έχει παρατηρηθεί η αύξηση των επιπέδων TBARS να προκαλείται σε ιστούς με αυξημένη συγκέντρωση GSH πχ.σπλήνα, λεπτό έντερο κτλ, γεγονός το οποίο μπορεί να συσχετίσει τους δύο αυτούς δείκτες μεταξύ τους και να προτίνει την προστατευτική δράση του κρασιού ενάντι στη λιπιδική υπεροξείδωση μέσω ενίσχυσης του συστήματος της γλουταθειόνης.

Το εκχύλισμα κρασιού φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ιστούς εκτός από το πάγκρεας στο οποίο η συγκέντρωση μειώθηκε, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η μεταβολή. Σε μία έρευνα των Kafantaris I. και συνεργατών η χορήγηση υπολειμμάτων σταφυλιών σε αρνιά φάνηκε να μην επηρεάζει τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κανένα ιστό με εξαίρεση το ήπαρ στο οποίο

μειωνόταν. [51] Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ανεξάρτητη δράση του κρασιού σε σχέση με την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών.

Τα επίπεδα της καταλάσης βρέθηκαν αυξημένα σε μερικούς ιστούς όπως το ήπαρ, το στομάχι, τον νεφρό και τον τετρακέφαλο μύ, ωστόσο σε κανέναν δεν έχει παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των δύο ομάδων επιμύων. Οι Kafantaris I. και συνεργάτες σε μία προσπάθεια εκτίμησης των επιπέδων της καταλάσης σε διάφορους ιστούς αρνιών έπειτα από χορήγηση υπολειμμάτων σταφυλιών, πλούσιων σε πολυφαινόλες, έδειξαν τη διατήρηση της συγκέντρωσης του ενζύμου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. [51] Το γεγονός αυτό φανερώνει την ανεξάρτητη δράση της καταλάσης σε σχέση με το κρασί. Στα μάτια και στους πνεύμονες δεν καταφέραμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του ενζύμου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα μάτια έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προκειμένου να καταπολεμήσουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείτε από την επαναλαμβανόμενη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Η CAT είναι ένα ένζυμο που ανήκει στους μηχανισμούς αυτούς κι εντοπίζεται κυρίως στο επιθήλιο του φακού και το επιθήλιο του κερατοειδούς. [53, 59] Στους πνεύμονες η καταλάση εκφράζεται κατά προτίμηση σε βρογχιολικά και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ανικανότητα εντοπισμού του ενζύμου αυτού στα πειράματά μας μπορεί να οφείλεται σε μειωνεκτώματα της μεθόδου όπως είναι η απαίτηση σύγχρονου φωτόμετρου με δυνατότητα εκπομπής ακτινοβολίας χαμηλού μήκους κύματος, η παρεμβολή παραπροϊόντων κτλ.

Η SOD βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ελεύθερων ριζών. Η χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού φάνηκε να προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της SOD στο λεπτό έντερο, στον σπλήνα και στους όρχεις της ομάδας χορήγησης. Στους ίδιους ιστούς τα επίπεδα της γλουταθειόνης βρέθηκαν αυξημένα. Σε μία έρευνα της Makri S. και συνεργατών η χορήγηση ζωοτροφής με βιοδραστικές ενώσεις υπολυμάτων ελαιουργείου, πλούσιας σε πολυφαινόλες, σε αρνιά φάνηκε να διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της SOD στην καρδιά, τον τετρακέφαλο μύ και τον εγκέφαλο, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματά μας. [49] Με βάση τα δεδομένα αυτά υποθέτουμε ότι το κρασί ενισχύει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως αυτούς που σχετίζονται με το σύστημα της GSH, ενώ αναστέλλει άλλους προκειμένου να επιτευχθεί οξειδοαναγωγική ισορροπία.

Η συγκέντρωση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από το εκχύλισμα κρασιού εφόσον τα επίπεδα της παρέμειναν σταθερά σε πολλούς από τους ιστούς των επιμύων που μελετήθηκαν μετά τη χορήγηση. Εξαιρεση αποτελεί ο ιστός του εγκεφάλου στον οποίο έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική μείωση του ενζύμου για την ομάδα χορήγησης και πιθανόν να οφείλεται στην αρνητική επίδραση της αιθανόλης του κρασιού στον ιστό αυτό.

Η GPx είναι ένα ένζυμο το οποίο καταστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση. Τα επίπεδα του ενζύμου αυτού αναμένεται να είναι αυξημένα σε ιστούς όπου έχουν βρεθεί

υψηλά επίπεδα TBARS και μειωμένα σε ιστούς με χαμηλά επίπεδα TBARS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής, η συγκέντρωση της GPx φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη μόνο στο αίμα της ομάδας χορήγησης, ενώ για τους υπόλοιπους ιστούς δεν έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης του ενζύμου. Όσον αφορά τα επίπεδα των TBARS στο αίμα, βρέθηκαν αυξημένα έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού χωρίς όμως κάποια στατιστική σημαντικότητα.

Η GPx χρησιμοποιεί το ίδιο υπόστρωμα με την CAT, δηλαδή το H₂O₂ κι αναλαμβάνει δράση μόνο όταν τα επίπεδα του H₂O₂ είναι φυσιολογικά ή χαμηλά, ενώ η CAT όταν τα επίπεδα του H₂O₂ είναι υψηλά. [38, 40] Σύμφωνα με τα παρόντα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα κρασιού δεν προκαλεί μεταβολές στις συγκεντρώσεις των δύο ενζύμων, με εξαίρεση την GPx στο αίμα. Παρόλα αυτά με βάση τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού έχουν την ικανότητα να ενισχύουν το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της, μεταφοράς, δράσης της κτλ. [46, 51] Με βάση όλα τα παραπάνω, το κρασί φαίνεται να μην επηρεάζει τη συγκέντρωση των GPx, GR και CAT, ωστόσο δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο αύξησης της λειτουργικότητας των ενζύμων αυτών μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οικονομία της οινοποιίας σήμερα έρχεται αντιμέτωπη με πολλές προκλήσεις όπως η συνεχώς μεταβαλλόμενη κατανάλωση οίνου, το περιβάλλον, η παγκόσμια πανδημία covid-19, η αυξανόμενη αγορά, οι πιστοποιήσεις που ενισχύουν τον ανταγωνισμό κτλ. Για τους λόγους αυτούς και πολλούς άλλους, η κατανόηση της ευεργετικής και μη δράσης του οίνου τείθεται απαραίτητη.

Στην πειραματική αυτή εργασία έγινε εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα και ιστούς αρσενικών επιμύων έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος ξινόμαυρου κρασιού. Δεν χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επιμύες για να μην υπάρχει μεταβολή της συμπεριφοράς τους, η οποία εκδηλώνεται ανάλογα με τη φάση του οιστρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν παραπάνω και φανέρωσαν αρκετά ενδιαφέροντα ευρήματα τα οποία αξίζει να συνοψιστούν στο σημείο αυτό.

Η χορήγηση εκχυλίσματος ξινόμαυρου οίνου φαίνεται να επηρεάζει την οξειδοαναγωγική ομοιότητα σε πολλούς ιστούς, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Συγκεκριμένα ενισχύει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με το σύστημα της γλουταθειόνης ενώ καταστέλλει μερικούς άλλους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση της αύξησης των επιπέδων της GSH στο πάγκρεας, στον σπλήνα, στους όρχεις, στον τετρακέφαλο μύ, στο αίμα, στο λεπτό και στο παχύ έντερο και την παράλληλη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα μάτια, στους πνεύμονες, στο στομάχι, στους όρχεις και στον τετρακέφαλο μύ. Στο σύστημα της γλουταθειόνης ανήκουν αρκετά ένζυμα, μερικά από τα οποία σχετίζονται με τη βιοσύνθεση, μεταφορά και δράση της GSH. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι η GPx, GR, GS, GST κτλ. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι πολυφαινόλες που εντοπίζονται στα κρασιά έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τη δράση των ενζύμων αυτών. Τα αποτελέσματα μας φαίνεται να μην συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών, εφόσον το εκχύλισμα ξινόμαυρου κρασιού που χορηγήθηκε δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων, με εξαίρεση την SOD η οποία μειώθηκε στον σπλήνα, στο λεπτό έντερο και στους όρχεις, την GPx η οποία αυξήθηκε στο αίμα και η GR η οποία μειώθηκε στον εγκέφαλο της ομάδας χορήγησης. Ωστόσο δεν αποκλείεται το γεγονός ενίσχυσης της λειτουργικότητας των ενζύμων αυτών μέσω διαφόρων μηχανισμών ανεξάρτητων της συγκέντρωσης της GSH. Η εφαρμογή άλλων μεθόδων όπως Real Time PCR και Western Blot θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν τη θεωρία αυτή μελετώντας την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα σε πραγματικό χρόνο και την ποιοτική ανίχνευση των ενζύμων αυτών αντίστοιχα, έπειτα από χορήγηση του εκχυλίσματος ξινόμαυρου οίνου. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό εύρημα της πειραματικής εργασίας μάς ήταν η αρνητική επίδραση του εκχυλίσματος κρασιού, ιδιαίτερα σε ιστούς με αυξημένη λιπιδική σύσταση ή ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες ή αυξημένα επίπεδα GSH, μέσω αύξησης της λιπδικής υπεροξειδωσης. Οι ιστοί αυτοί ήταν ο εγκέφαλος, ο σπλήνας, τα νεφρά και το λεπτό έντερο όπου βρέθηκαν αυξημένα τόσο τα επίπεδα των TBARS όσο και της GSH, συσχετίζοντας τους δύο αυτούς δείκτες μεταξύ τους.

Συνοψίζοντας θα λέγαμε ότι το εκχύλισμα κρασιού ενισχύει το αντιοξειδωτικό σύστημα των πνευμόνων, του ήπατος, του παγκρέατος, των νεφρών, των εντέρων, του τετρακέφαλου μύ και ιδιαίτερα των όρχεων και του αίματος. Παράλληλα όμως προκαλεί αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στον εγκέφαλο, στον σπλήνα, στον νεφρό, στο λεπτό έντερο και στο αίμα. Η καρδιά και τα μάτια φαίνεται να μην επηρεάζονται από τη δράση του κρασιού. Το γεγονός αυτό αποτελεί παράδοξο, εφόσον μεγαλώνοντας έχουμε ακούσει πολλές φορές τη φράση "Ένα ποτήρι κρασί την ημέρα κάνει καλό στην καρδιά". Τελικά η κατανάλωση κρασιού δεν κάνει καλό στην καρδιά αλλά στο αίμα, όσον αφορά το οξειδοαναγωγικό σύστημα. Τέλος θα καταλήγαμε στο ότι η κατανάλωση ξινόμαυρου κρασιού επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση πολλών ιστών μέσω διάφορων μηχανισμών. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών λαμβάνοντας υπόψη διάφορες παραμέτρους πχ σύσταση, δοσολογία κτλ θεωρείται επιτακτική ανάγκη για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που απειλούν σήμερα την οινοποιία.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. https://abc.herbalgram.org/site/SPageServer/?jsessionid=00000000.app20052b?NONCE_TOKEN=7BC4ECEFEF528FE1097C49700D42C51C&pagename=AAH_Grape
2. Grape berry diagram en.svg. Original Author: LadyofHats, Derived 1: Peter coxed, Derived 2: Salix
3. Τσέτουρας Λ. Παναγιώτης, 2008, Η επιστήμη του Κρασιού στην Πράξη - Β έκδοση, Σταμούλης,
4. Snopek, Lukas et al. "Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection." *Molecules* (Basel, Switzerland) vol. 23,7 1684. 11 Jul. 2018, doi:10.3390/molecules23071684
5. Artero, Ana et al. "The impact of moderate wine consumption on health." *Maturitas* vol. 80,1 (2015): 3-13. doi:10.1016/j.maturitas.2014.09.007
6. Vermerris W. , Nicholson R., *Phenolic Compound Biochemistry* (2006), Pages 1-34
7. Shahidi F., Ambigaipalan P., Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review, *Journal of Functional Foods* (2015), Pages 820- 897
8. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002 Oct;13(10):572-584. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5. PMID: 12550068.
9. Biasi, Fiorella et al. "Wine consumption and intestinal redox homeostasis." *Redox biology* vol. 2 795-802. 18 Jun. 2014, doi:10.1016/j.redox.2014.06.008
10. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J.* 2011 Sep-Oct;34(5):449-60. PMID: 22035889.
11. Ananga, A.; Georgiev, V.; Tsoлова, V. Manipulation and engineering of metabolic and biosynthetic pathway of plant polyphenols. *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19, 6186–6206.
12. Ali, K.; Maltese, F.; Choi, Y.; Verpoorte, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem. Rev.* 2010, 9, 357–378.
13. Tariba, Blanka. "Metals in wine--impact on wine quality and health outcomes." *Biological trace element research* vol. 144,1-3 (2011): 143-56. doi:10.1007/s12011-011-9052-7
14. de Moura RS, Miranda DZ, Pinto AC, Sicca RF, Souza MA, Rubenich LM, Carvalho LC, Rangel BM, Tano T, Madeira SV, Resende AC. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Sep;44(3):302-9. doi: 10.1097/01.fjc.0000133060.10597.3c. PMID: 15475826.
15. Micallef, M., Lexis, L. & Lewandowski, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 6, 27 (2007). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-6-27>
16. Muñoz-González, Irene et al. "Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 62,20 (2014): 4731-7. doi:10.1021/jf501768p
17. <https://vinepair.com/wine-colonized-world-wine-history/#18>

18. <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/wine-producing-countries>
19. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/wine_el
20. <https://migration.ucdavis.edu/rmn/blog/post/?id=2600>
21. <https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf>
22. Τετραλογία "Ο Οίνος στην ποίηση" Ίδρυμα Φανή Μπουτάρη
23. <https://winefolly.com/deep-dive/what-is-aoc-wine/>
24. Σεχρεμέλη Παναγιώτα (2018), "Ανάλυση του κλάδου της οινοποιίας στην Ελλάδα", πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Πειραιώς
25. <https://www.winemonthclub.com/the-wine-making-process>
26. https://www.erosmykonos.gr/?page_id=879
27. <https://www.winemag.com/2019/09/24/how-white-wine-is-made/>
28. <https://www.winemag.com/2019/10/08/how-red-wine-is-made/>
29. FAO - agribusiness handbook: grapes wine
30. Sergio Di Meo, Paola Venditti, "Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, Article ID 9829176, 32 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
31. Sharma, Ganesh N et al. "A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments." *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, vol. 28, 2 (2018): 139-154. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258
32. Sies, Helmut et al. "Oxidative Stress." *Annual review of biochemistry* vol. 86 (2017): 715-748. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037
33. Li, Xinyuan et al. "Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers." *Journal of hematology & oncology* vol. 6 19. 25 Feb. 2013, doi:10.1186/1756-8722-6-19
34. H. Sies, "Oxidative stress: introductory remarks," in *Oxidative Stress*, H. Sies, Ed., pp. 1–7, Academic Press, San Diego, 1985.
35. Lobo, V et al. "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." *Pharmacognosy reviews* vol. 4, 8 (2010): 118-26. doi:10.4103/0973-7847.70902
36. Valko, M et al. "Metals, toxicity and oxidative stress." *Current medicinal chemistry* vol. 12, 10 (2005): 1161-208. doi:10.2174/0929867053764635
37. Marrocco, Ilaria; Altieri, Fabio; Peluso, Ilaria (2017). Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(), 1–32. doi:10.1155/2017/6501046
38. Su, Lian-Jiu et al. "Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis." *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2019 5080843. 13 Oct. 2019, doi:10.1155/2019/5080843
39. Velena, Astrida et al. "1,4-Dihydropyridine Derivatives: Dihyronicotinamide Analogues-Model Compounds Targeting Oxidative Stress." *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2016 (2016): 1892412. doi:10.1155/2016/1892412
40. <https://ebrary.net/17945/environment/antioxidants>

41. Hacısevkd, Aysun. "An Overview of Ascorbic Acid Biochemistry Askorbdk Asdt Bdyokdmyasina Bdr Bakış." (2012)
42. Di Meo, S., Venditti, P. "Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. doi:10.1155/2020/9829176
43. https://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies
44. Veskoukis, Aristidis S et al. "Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied." *Free radical biology & medicine* vol. 47,10 (2009): 1371-4. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.014
45. Circu, Magdalena L, and Tak Yee Aw. "Intestinal redox biology and oxidative stress." *Seminars in cell & developmental biology* vol. 23,7 (2012): 729-37. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.014
46. Μηνάς Μπισμπίκης. Προσδιορισμός και αξιολόγηση των διατιθέμενων προς απορρόφηση αντιοξειδωτικών από Μεσογειακά ξηρά φρούτα. Αθήνα 2017
47. Aquilano, Katia et al. "Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant." *Frontiers in pharmacology* vol. 5 196. 26 Aug. 2014, doi:10.3389/fphar.2014.00196
48. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, Gerasopoulos K, Stagos D, Mitsagga C, Giavasis I, Makri S, Petrotos K, Kouretas D. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017 Oct;101(5):e108-e121. doi: 10.1111/jpn.12569. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27753147.
49. Makri S, Raftopoulou S, Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Nepka C, Veskoukis AS, Kouretas D. Biofunctional Feed Supplemented With By-products of Olive Oil Production Improves Tissue Antioxidant Profile of Lambs. *In Vivo*. 2020 Jul-Aug;34(4):1811-1821. doi: 10.21873/invivo.11976. PMID: 32606151; PMCID: PMC7439886.
50. Makri S, Kafantaris I, Savva S, Ntanou P, Stagos D, Argyroulis I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Gerasopoulos K, Petrotos K, Komiotis D, Kouretas D. Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs. *In Vivo*. 2018 Mar-Apr;32(2):291-302. doi: 10.21873/invivo.11237. PMID: 29475912; PMCID: PMC5905197.
51. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, Gerasopoulos K, Stagos D, Mitsagga C, Giavasis I, Makri S, Petrotos K, Kouretas D. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017 Oct;101(5):e108-e121. doi: 10.1111/jpn.12569. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27753147.
52. Stagos D, Soulitsiotis N, Tsadila C, Papaeconomou S, Arvanitis C, Ntontos A, Karkanta F, Adamou-Androulaki S, Petrotos K, Spandidos DA, Kouretas D, Mossialos D. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int J Mol Med*. 2018 Aug;42(2):726-734. doi: 10.3892/ijmm.2018.3656. Epub 2018 May 4. PMID: 29749429; PMCID: PMC6034916.

53. Murat Dogru; Takashi Kojima; Cem Simsek; Kazuo Tsubota (2018) Investigative Ophthalmology & Visual Science November 2018, Vol.59, DES163-DES168. doi:<https://doi.org/10.1167/iovs.17-23402>
54. Salim, Samina. "Oxidative Stress and the Central Nervous System." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 360,1 (2017): 201-205. doi:10.1124/jpet.116.237503
55. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr.* 2012 Jan;50(1):35-9. doi: 10.3164/jcbrn.11-115SR. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22247598; PMCID: PMC3246180.
56. Emin Ozbek, "Induction of Oxidative Stress in Kidney", *International Journal of Nephrology*, vol. 2012, Article ID 465897, 9 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/465897>
57. O. A. Adaramoye and A. Aluko, "Methanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* attenuates renal dysfunction induced by chronic ethanol administration in Wistar rats," *Alcohol and Alcoholism*, vol. 46, no. 1, Article ID agq082, pp. 4–9, 2011.
58. Ghani, Md Ahsan et al. "Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay." *Food chemistry* vol. 230 (2017): 195-207. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.127
59. Leo A. Kim, Amol Ganvir. "Role of oxidative stress in Ophthalmology." *International Ophthalmologists contest.* 7 Dec. 2021. https://eyewiki.aao.org/Role_of_oxidative_stress_in_Ophthalmology
60. Tekos F, Makri S, Skaperda ZV, Patouna A, Terizi K, Kyriazis ID, Kotseridis Y, Mikropoulou EV, Papaefstathiou G, Halabalaki M, Demetrios K. Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metabolites.* 2021 Jul 2;11(7):436. doi: 10.3390/metabo11070436. PMID: 34357330; PMCID: PMC8304343.
61. Hacısevki, Aysun. "An Overview of Ascorbic Acid Biochemistry Askorbik Asit Biyokimyasında Bakış." (2012).
62. Panchal SK, Brown L. Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. *Eur J Nutr.* 2013 Feb;52(1):397-408. doi: 10.1007/s00394-011-0277-1. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22105311.
63. Toaldo IM, Cruz FA, da Silva EL, Bordignon-Luiz MT. Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (*Vitis labrusca* L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals. *Nutr Res.* 2016 Aug;36(8):808-17. doi: 10.1016/j.nutres.2016.04.010. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27440535.
64. de-la-Fuente-Blanco A, Ferreira V. Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) for the (Semi)Quantitative Screening of Wine Aroma. *Foods.* 2020 Dec 18;9(12):1892. doi: 10.3390/foods9121892. PMID: 33353150; PMCID: PMC7766350.
65. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019 Apr;21(4):425-435. doi: 10.1002/ejhf.1320. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30338885; PMCID: PMC6607515.

66. Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, Kafantaris I, Makri S, Stagos D, Gerasopoulos K, Anisimov NY, Tsatsakis AM, Kouretas D. Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Rep.* 2017 Jun 23;4:364-372. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.06.007. PMID: 28959661; PMCID: PMC5615154.
67. Veskoukis AS, Vassi E, Poulas K, Kokkinakis M, Asproдини E, Haroutounian S, Kouretas D. Grape Stem Extracts From Three Native Greek Vine Varieties Exhibit Strong Antioxidant and Antimutagenic Properties. *Anticancer Res.* 2020 Apr;40(4):2025-2032. doi: 10.21873/anticancer.14159. PMID: 32234893.
68. Kouka P, Tekos F, Papoutsaki Z, Stathopoulos P, Halabalaki M, Tsantarliotou M, Zervos I, Nepka C, Liesivuori J, Rakitskii VN, Tsatsakis A, Veskoukis AS, Kouretas D. Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicol Rep.* 2020 Feb 13;7:421-432. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.02.007. PMID: 32140426; PMCID: PMC7052070.
69. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Makri S, Stagos D, Gerasopoulos K, Petrotos K, Goulas P, Kouretas D. Effects of Dietary Grape Pomace Supplementation on Performance, Carcass Traits and Meat Quality of Lambs. *In Vivo.* 2018 Jul-Aug;32(4):807-812. doi: 10.21873/invivo.11311. PMID: 29936462; PMCID: PMC6117773.
70. Costa C, Tsatsakis A, Mamoulakis C, Teodoro M, Briguglio G, Caruso E, Tsoukalas D, Margina D, Dardiotis E, Kouretas D, Fenga C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem Toxicol.* 2017 Dec;110:286-299. doi: 10.1016/j.fct.2017.10.023. Epub 2017 Oct 14. PMID: 29042289.