



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Τοξικολογία”

Μεταπτυχιακή διατριβή

« Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα αίματος διαφορετικών φυλών προβάτων σε συνδυασμό με δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα»



Νεχαλιώτη Παρασκευή Μαρία

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Λάρισα, 2022

« Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα αίματος διαφορετικών φυλών προβάτων σε συνδυασμό με δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα.»

Νεχαλιώτη Παρασκευή Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

« Assessment of redox-related biomarkers in blood samples from different sheep breeds and their correlation with antioxidant milk capacity.»

Nechalioti Paraskevi Maria

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios

Laboratory of animal physiology

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων), Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

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

Βαλάση Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια «Φυσιολογία των Ζώων», Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα πρωτίστως, να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση μίας ενδιαφέρουσας διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και τα ερεθίσματα που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Βεσκούκη Αριστείδη και την κα Βαλάση Ειρήνη που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την κα Σκαπέρδα Βασιλική-Ζωή, η οποία εκτελεί τη διδακτορική της διατριβή, και τα δείγματα που χρησιμοποίησα για να εκτελέσω τα πειράματά μου, προήλθαν από το δικό της πρόγραμμα. Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφέρω την απέραντη στήριξη αλλά και βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια περάτωσης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης, όλη την ομάδα του εργαστηρίου «Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών» για τη πολύτιμη βοήθειά τους, καθώς ήταν εκεί να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου πάντα με φιλική διάθεση.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που στηρίζει την κάθε μου επιλογή και είναι πάντα δίπλα μου πρόθυμη να με συμβουλευσει.

Περιεχόμενα

<i>Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή</i>	3
<i>Ευχαριστίες</i>	4
<i>Περιεχόμενα</i>	5
<i>Περίληψη</i>	12
<i>Abstract</i>	14
<i>1. Εισαγωγή</i>	16
<i>1.1 Ελεύθερες Ρίζες</i>	16
<i>1.2 Δραστικές μορφές</i>	18
<i>1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου</i>	18
<i>1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου</i>	19
<i>1.2.3 Δραστικές Μορφές Θείου και Χλωρίου</i>	21
<i>1.3 Παραγωγή δραστικών μορφών in vivo</i>	22
❖ <i>Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών</i>	22
❖ <i>Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών</i>	26
<i>1.4 Βιολογικές λειτουργίες ελευθέρων ριζών</i>	26
<i>1.4.1 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών</i>	26
<i>1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών</i>	27
<i>1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί</i>	30
<i>1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί</i>	32
<i>1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί</i>	34
<i>1.6 Οξειδωτικό στρες</i>	38
<i>1.7 Οξειδωτικό στρες και παθογένεια ζώων</i>	41
<i>1.8 Προβατοτροφία</i>	43
<i>1.8.1 Φυλές προβάτων</i>	44

1.9	<i>Πρόβειο γάλα</i>	47
1.9.1	<i>Αντιοξειδωτική ικανότητα πρόβειου γάλακτος</i>	50
2.	<i>Σκοπός</i>	54
3.	<i>Υλικά και Μέθοδοι</i>	55
3.1	<i>Πειραματικός σχεδιασμός</i>	55
3.2	<i>Μέθοδοι λήψης δειγμάτων</i>	56
3.3	<i>Πρωτόκολλα εκτίμησης οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα προβάτων</i>	56
3.3.1	<i>Προσδιορισμός επιπέδων αιμοσφαιρίνης</i>	56
3.3.2	<i>Προσδιορισμός επιπέδων συνολικής πρωτεΐνης</i>	57
3.3.3	<i>Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης</i>	58
3.3.4	<i>Προσδιορισμός της δραστικότητας καταλάσης</i>	58
3.3.5	<i>Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας</i>	61
3.3.6	<i>Προσδιορισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης</i>	62
3.3.7	<i>Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων</i>	64
3.4	<i>In vitro cell-free αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρόβειου γάλακτος</i>	66
3.4.1	<i>Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}</i>	66
3.4.2	<i>Προσδιορισμός συνολικής αναγωγικής ικανότητας</i>	67
3.4.3	<i>Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•]</i>	68
3.5	<i>Στατιστική ανάλυση</i>	71
4.	<i>Αποτελέσματα</i>	72
4.1	<i>Αποτελέσματα συγκριτικών μετρήσεων Καραγκούνικης vs Lacaune φυλής προβάτων</i>	72
4.1.1	<i>Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα Καραγκούνικων και Lacaune προβάτων</i>	72
4.1.2	<i>Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα Καραγκούνικων και Lacaune προβάτων</i>	73

4.2	Αποτελέσματα συσχετίσεων δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας γάλακτος με δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα διαφορετικών φυλών προβάτων -----	74
4.2.1	Αποτελέσματα Καραγκούνικης φυλής προβάτων -----	74
4.2.2	Αποτελέσματα Lacaune φυλής προβάτων-----	76
4.3	Αποτελέσματα συγκριτικών μετρήσεων της Καραγκούνικης φυλής προβάτων (ελευθέρως βοσκής vs ενσταβλισμένων)-----	80
4.3.1	Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα Καραγκούνικων προβάτων-----	80
4.3.2	Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα Καραγκούνικων προβάτων -----	81
5.	Συζήτηση -----	82
6.	Βιβλιογραφία -----	93

Κατάλογος εικόνων

<i>Εικόνα 1: Παραδείγματα ελευθέρων ριζών με διαφορετικές προ-οξειδωτικές ικανότητες (Γάλαρης, 2016).</i>	16
<i>Εικόνα 2: Απλοποιημένη απεικόνιση ομολυτικής και ετερολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού στην χημική ένωση A-B. (Γάλαρης, 2016).</i>	17
<i>Εικόνα 3: Γραμμική παρουσίαση μιας αλυσιδωτής αντίδρασης (Κουμπής, 2015).</i>	17
<i>Εικόνα 4: Δραστικές μορφές οξυγόνου</i>	19
<i>Εικόνα 5: Δραστικές μορφές αζώτου</i>	20
<i>Εικόνα 6: NO-εξαρτώμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου (R. P. Patel et al. 1999).</i>	20
<i>Εικόνα 7: Δραστικές μορφές θείου και χλωρίου</i>	21
<i>Εικόνα 8: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών, δραστικών μορφών οξυγόνου (Warrach, Hussain, and Kayani 2020).</i>	22
<i>Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής ROS κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση (Stojković and Đorđević, 2017).</i>	23
<i>Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της ενδογενούς παραγωγής ROS (Dhawan 2014).</i>	25
<i>Εικόνα 11: Επίδραση ROS/RNS σε βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) (Singh et al. 2019).</i>	27
<i>Εικόνα 12: Αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης (González-Minero, Bravo-Díaz, and Ayala-Gómez 2020).</i>	28
<i>Εικόνα 13: Κύρια μονοπάτια σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων, (i) μέσω οξείδωσης καταλυόμενης από μέταλλο στις πλευρικές αλυσίδες Lys, Pro, Arg και Thr, (ii) με απευθείας οξείδωση σε Trp, (iii) ως προϊόντα προσθήκης προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε Lys και Arg. και (iv) αντίδρασης προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων με Cys, His και Lys (Fedorova, Bollineni, and Hoffmann 2014).</i>	30
<i>Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών (de Oliveira Silva and Batista 2017).</i>	31
<i>Εικόνα 15: Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών (Ali et al. 2020).</i>	32
<i>Εικόνα 16: Σύνοψη δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ajuwon, Marnewick, and Davids 2015).</i>	34

<i>Εικόνα 17: Αντιδράσεις κύκλου οξειδοαναγωγής γλουταθειόνης (Sonthalia, Daulatabad, and Sarkar 2016).</i>	35
<i>Εικόνα 18: Ορισμοί οξειδωτικού στρες</i>	38
<i>Εικόνα 19: Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών (Hernández-Camacho et al. 2018) (Oxidative Stress et al. 2021).</i>	39
<i>Εικόνα 20: Οξειδωτικό στρες και επαγόμενες ασθένειες (Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health n.d.,2021).</i>	39
<i>Εικόνα 21: Οξειδωτικό στρες και οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Sies 2018).</i>	40
<i>Εικόνα 22: Οξειδωτικό και αναγωγικό στρες (Bellezza et al. 2020).</i>	41
<i>Εικόνα 23: Συσχέτιση οξειδοαναγωγικής κατάστασης με την ευζωία, παραγωγικότητα και ποιότητα προϊόντων των ζώων (Skaperda, Veskoukis, and Kouretas 2019).</i>	42
<i>Εικόνα 24: Συστηματική κατάταξη προβάτου</i>	43
<i>Εικόνα 25: Κύριοι παραγωγοί αιγοπρόβειου κρέατος, πρόβειου γάλακτος στην Ε.Ε (Eurostat, 2017,2018).</i>	44
<i>Εικόνα 26: Πρόβατα της καραγκούνικης φυλής.</i>	46
<i>Εικόνα 27: Πρόβατο της φυλής Lacaune.</i>	47
<i>Εικόνα 28: Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος ανά είδος ζώου (https://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/)</i>	48
<i>Εικόνα 29: Σύσταση γάλακτος σε διαφορετικά γαλακτοπαραγωγά ζώα</i>	49
<i>Εικόνα 30: Αντιοξειδωτικά συστατικά γάλακτος ((Khan et al. 2019a).</i>	51
<i>Εικόνα 32: Αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού.</i>	55

Κατάλογος πινάκων

<i>Πίνακας 1: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης</i>	57
<i>Πίνακας 2: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης</i>	58
<i>Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης</i>	59

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό δραστικότητας καταλάσης-----	60
Πίνακας 5: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας-----	62
Πίνακας 6: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης-----	63
Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων-----	65
Πίνακας 8: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•+-----	67
Πίνακας 9: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας-----	69
Πίνακας 10: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας OH•-----	70

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός των δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα δύο γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, Καραγκούνικης και Lacaune. A) επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, B) δραστικότητα καταλάσης, C) επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), D) επίπεδα υπεροξειδωσης των λιπιδίων και E) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).-----	72
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας σε γάλα δύο γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, Καραγκούνικης και Lacaune. A) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•, B) αναγωγική δύναμη, C) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH•.-----	73
Διάγραμμα 3: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.-----	74
Διάγραμμα 4: Προσδιορισμός συσχέτισης της αναγωγικής ισχύος σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.-----	75

Διάγραμμα 5: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας $OH\bullet$ radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS. ----- 76

Διάγραμμα 6: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS. ----- 77

Διάγραμμα 7: Προσδιορισμός συσχέτισης της αναγωγικής ισχύος σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS. ----- 78

Διάγραμμα 8: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας $OH\bullet$ radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS. ----- 79

Διάγραμμα 9: Προσδιορισμός των δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα προβάτων Καραγκούνικης φυλής, ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων. A) επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, B) δραστικότητας καταλάσης, C) επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), D) επίπεδα υπεροξειδωσιών των λιπιδίων και E) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS). ----- 80

Διάγραμμα 10: Προσδιορισμός των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας σε γάλα προβάτων Καραγκούνικης φυλής, ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων. A) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $ABTS\bullet^+$, B) αναγωγική δύναμη, C) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $OH\bullet$. ----- 81

Περίληψη

Οι διαρκώς αυξανόμενες απαιτήσεις κατανάλωσης ζωικών προϊόντων εξαιτίας της ανοδικής πορείας που ακολουθεί ο παγκόσμιος πληθυσμός, καθίστανται από τις βασικότερες προκλήσεις των σύγχρονων κοινωνιών. Τις τελευταίες δεκαετίες, η διεθνής παραγωγή κρέατος έχει διπλασιαστεί, ενώ αντίστοιχη αύξηση σημειώνεται και στην παραγωγή γάλακτος. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί μια τάση των καταναλωτών να αναζητούν προϊόντα υψηλής διατροφικής και βιολογικής αξίας, με ιδιαίτερη ζήτηση να καταγράφεται στην αγορά για το πρόβειο γάλα, το οποίο υπερέχει του αγελαδινού χάρη στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και ασβέστιο. Ωστόσο, η απόδοση του σε μικρές ποσότητες απαιτεί εντατικοποίηση της εκτροφής παραγωγικών προβάτων, ώστε να ανταποκριθούν σε μια ολοένα και πιο απαιτητική καταναλωτική αγορά. Οι εντατικοί ρυθμοί ανάπτυξης της ζωικής παραγωγής παρότι εκπληρώνουν αυτόν τον στόχο, έχουν οδηγήσει ταυτόχρονα στην εμφάνιση αρκετών προβλημάτων υγείας στα ζώα εκτροφής. Καθίσταται επομένως, επιβεβλημένη ανάγκη των καιρών μας να επιτευχθεί βιωσιμότητα και να ενισχυθεί η ευημερία των ζώων, προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγικότητα και να βελτιωθεί η ασφάλεια, η ποιότητα και η εμπορική αξία των ζωικών προϊόντων. Λαμβάνοντας υπόψη τα ανακύπτοντα ζητήματα, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό να προσδιοριστούν τα βασικά επίπεδα οξειδοαναγωγικής κατάστασης δύο διαφορετικών γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, μίας εγχώριας και μίας εισαχθείσας, καθώς και η συσχέτιση αυτής με δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας του παραγόμενου γάλακτος. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αξιολογήθηκαν βιοδείκτες οξειδωτικού στρες 40 προβάτων, εκ των οποίων 30 ανήκαν στην Καραγκούνικη φυλή και 10 στη γαλλική Lacaune. Επιπλέον στην ανάλυση συμπεριλήφθηκε και ο παράγοντας του σχήματος βόσκησης και της πρακτικής διαχείρισης των παραγωγικών ζώων. Αναλυτικότερα, με χρήση φασματομετρικών μεθόδων προσδιορίστηκαν στο αίμα: τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της δραστηριότητας καταλάσης (CAT), της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (CARBS) ως δείκτες οξειδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Ακολούθως, αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση πρόβειου γάλακτος μέσω της μεθόδου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+, συνολικής αναγωγικής ισχύος και εξουδετέρωσης της ρίζας OH•. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν

ότι τα Καραγκούνικα πρόβατα έχουν αυξημένα εγγενή αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα σε σύγκριση με τα Lacaune, καθώς εμφάνισαν σημαντικά αυξημένες τιμές στο βιοδείκτη της γλουταθειόνης και στη δραστικότητα του ενζύμου καταλάσης ($p < 0.05$), αλλά κυρίως παρουσίασαν ισχυρή μείωση της οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια και πρωτεΐνες ($p = 0.0002$, $p = 0.0004$ αντίστοιχα). Επίσης, το γάλα της ίδιας φυλής επέδειξε μειωμένα επίπεδα IC50 όσον αφορά την αδρανοποίηση των ριζών ABTS•+, OH• ($p < 0.05$), και άρα αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μάλιστα, διαφαίνεται πως αξιοσημείωτο ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του προϊόντος διαδραματίζει ο τρόπος εκτροφής, καθώς γάλα παραγόμενο από πρόβατα ελευθέρως βοσκής ήταν σημαντικά ισχυρότερο από εκείνο των ενσταβλισμένων τόσο στη μέθοδο της αναγωγικής ικανότητας ($p < 0,0001$), όπως και στην αδρανοποίηση της ρίζας OH• ($p = 0,0002$). Ακόμη, η στατιστική ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών παραμέτρων στο αίμα και στο γάλα, αποκάλυψε πως ο προσδιορισμός των ενδογενών αντιοξειδωτικών δύναται να αποτελέσει βιοδείκτη για την πρόβλεψη της ποιότητας του γάλακτος και στις δύο φυλές. Η συγκεκριμένη πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί από κτηνοτρόφους προκειμένου να βελτιώσουν την ποιότητα των προϊόντων τους μέσω διατροφικής παρέμβασης. Τέλος, η αποκάλυψη του συγκριτικού πλεονεκτήματος της Καραγκούνικης φυλής έναντι της γαλλικής Lacaune θα συμβάλλει στην ενίσχυση του εγχώριου πληθυσμού προβάτων και της εξαγωγικής και αναπτυξιακής προοπτικής της παραγωγής τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Abstract

The continuous rise in worldwide population results in a gradually increasing demand for animal products and this comprises one of the major challenges of modern societies. Within the last decades, global meat and milk production has shown a two-fold increase in many countries, while a trend for consuming high nutritional and biological value products is constantly getting more and more popular. Sheep-derived milk constitutes a characteristic example that has gained market size due to the product's quality and the nutrient content; the high nutritional value is due to the higher concentrations of proteins, fats, vitamins, and minerals when compared to the milks from other domesticated mammals. However, the mismatch between demand and low production yield of sheep milk due to its seasonal character, has led to the intensification of livestock production systems, achieving greater production of their products, but also negatively affecting welfare of animals. Consequently, ensuring sustainability and well-being of farm animals is of vital importance to accomplish improved quality, safety and market value of animal-derived products. In the light of the above considerations, determining the redox status in blood samples of production animals can be a representative index of their wellness. Hence, the aim of this master's thesis was the assessment of baseline levels of redox-related biomarkers in blood of two different dairy sheep breeds (Karagouniki and Lacaune) reared in Greece using non-interventional methodologies and their correlation with antioxidant milk capacity. Karagouniki breed shows significant interest in the field of milk production, as it represents one of the most prominent indigenous sheep breeds of Greece, while Lacaune breed is presently a high milk yield breed worldwide, that has been imported and adjusted to our country. The data analysis involved also the grazing regimen and the feeding practice of productive animals. In detail, blood samples of 40 sheep were collected and examined using spectrophotometric methods to evaluate: the levels of reduced glutathione (GSH), the activity of the antioxidant enzyme catalase (CAT), the total antioxidant capacity (TAC), the levels of species reacting with thiobarbituric acid (TBARS) and finally the levels of protein carbonyls (CARBS), reflecting oxidative damage to lipids and proteins respectively. In addition, we determined the antioxidant activity of sheep-derived milk by estimating the scavenging $ABTS^{\bullet+}$ and OH^{\bullet} radicals, as well as through the reducing power method. The results revealed improved redox

status in Karagouniko sheep compared to Lacaune as the levels of GSH and the catalase activity were significantly increased in the first sheep breed ($p < 0.05$), alongside with a significant decrease in detrimental oxidative damage levels in lipids and proteins ($p = 0.0002$ and $p = 0.0004$ respectively). Moreover, the milk of the former breed exerted higher antioxidant activity in the methods of ABTS⁺ and OH[•] radicals scavenging ($p < 0.05$). It is of great interest that the breeding scheme seems to be related with the antioxidant properties of the product as milk derived from free-grazing sheep demonstrated higher reducing power ($p < 0.0001$) and OH radical scavenging activity ($p = 0.0002$) compared to those systemically fed in a farm. Correlation analysis was performed between each redox biomarker in blood and antioxidant parameters in milk, revealing their potential use to predict product quality. This would allow farmers to nutritionally intervene to improve the quality of their products. Considering the previous mentioned points, it is obvious that Karagouniki sheep breed reveals a comparative advantage over the French Lacaune, a critical endpoint for development of the domestic livestock sector that increases also the added value of local sheep milk and its export prospects.

1. Εισαγωγή

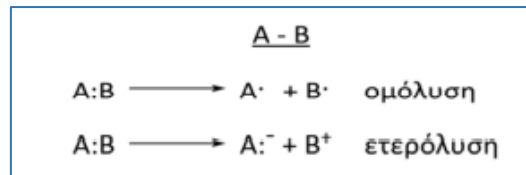
1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) προσδιορίζεται οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν περιέχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα σθένους και δύναται αυτοδύναμης ύπαρξης (Halliwell and Gutteridge 1990). Η παρουσία μη συζευγμένων ηλεκτρονίων καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ασταθή και κατ' επέκταση ιδιαίτερα δραστικά μόρια, τα οποία προκειμένου να συμπληρώσουν την ηλεκτρονιακή τους στιβάδα και να μεταβούν σε σταθερότερη ενεργειακά κατάσταση, αποσπών ηλεκτρόνια από παρακείμενα μόρια. Ωστόσο, η δραστηριότητα αυτών των μορίων ποικίλει καθώς υπάρχουν ρίζες εξαιρετικά δραστικές που έλκουν ηλεκτρόνια από κάθε γειτονικό μόριο και άλλες λιγότερο που αντιδρούν με συγκεκριμένα μόρια-στόχους και έχουν μεγάλη φυσιολογική σημασία (Γάλαρης, 2016).

HO [•]	Cl [•]	Πάρα πολύ δραστικές
R-COO [•]	R-CO [•]	Πολύ δραστικές
O ₂ ^{•-}	NO [•]	Λιγότερο δραστικές
Asc [•]		Σταθερές

Εικόνα 1: Παραδείγματα ελευθέρων ριζών με διαφορετικές προ-οξειδωτικές ικανότητες (Γάλαρης, 2016).

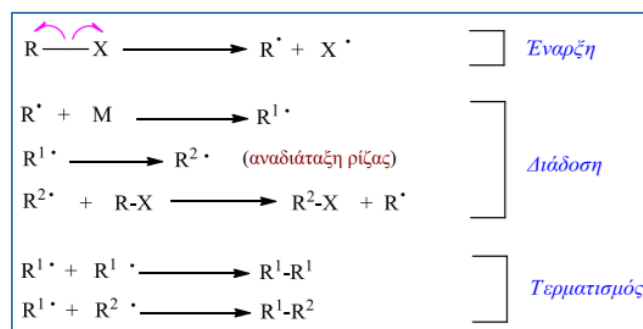
Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διακριτούς τρόπους. Ο πρώτος και συνηθέστερος μηχανισμός αφορά τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, στις οποίες συμβαίνει πρόσληψη ή απώλεια ηλεκτρονίου από ένα άτομο ή μόριο. Ο δεύτερος τρόπος σχετίζεται με την ομολυτική σχάση ενός ομοιοπολικού δεσμού με την παροχή ενέργειας (είτε θερμότητας είτε υπεριώδους ή ιονίζουσας ακτινοβολίας) που συνεπάγεται το διαμερισμό του ζεύγους ηλεκτρονίων σε δύο νεοσυντιθέμενες χημικές οντότητες και το σχηματισμό είτε δύο ελευθέρων ριζών (ομόλυση) είτε δύο ιόντων, κατιόντος και ανιόντος (ετερόλυση) (Γάλαρης, 2016).



Εικόνα 2: Απλοποιημένη απεικόνιση ομολυτικής και ετερολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού στην χημική ένωση A-B. (Γάλαρης, 2016).

Σχετικά με τις αντιδράσεις που συμμετέχουν, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν α) με άλλα αντίστοιχα δραστικά μόρια, να ενώσουν τα ασύζευκτά τους ηλεκτρόνια και να σχηματιστεί ένας νέος ομοιοπολικός δεσμός καθώς και β) με σταθερά μόρια, τα οποία με την απόσπαση ή απόκτηση ενός ηλεκτρονίου θα μετατραπούν τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με τη μεταβίβαση ηλεκτρονίων από στόχο σε στόχο να επαχθεί αλυσιδωτή αντίδραση παραγωγής ριζών, γεγονός που θα τερματιστεί με την παραγωγή ενός μη δραστικού προϊόντος (“Free Radicals in Biology and Medicine - Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge - Βιβλία Google” n.d.).

Η επαγωγή αλυσιδωτής αντίδρασης μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητή παρατηρώντας το μηχανισμό δράσης των ελευθέρων ριζών, που αποτελείται από τρία στάδια. Κατά την έναρξη, μη ριζικά μόρια μετατρέπονται σε ριζικά μέσω της ομολυτικής διάσπασης δεσμών, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο, τη διάδοση, οι δραστικές ρίζες του προηγούμενου σταδίου αλληλεπιδρούν με άλλα ουδέτερα μόρια, παράγοντας νέες ρίζες. Στο τελευταίο στάδιο του τερματισμού, πραγματοποιείται η αντίδραση δύο ριζών για τον σχηματισμό μιας μη ρίζας (Κουμπής, 2015).



Εικόνα 3: Γραμμική παρουσίαση μιας αλυσιδωτής αντίδρασης (Κουμπής, 2015).

1.2 Δραστικές μορφές

Οι δραστικές μορφές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις τύπους ανάλογα με το κεντρικό άτομο το οποίο διαθέτουν: 1. δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), 2. δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), 3. δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) και 4. δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) με κέντρο το οξυγόνο, άζωτο, θείο και χλώριο αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ο ορισμός δραστικές μορφές συμπεριλαμβάνει και μη ριζικά μόρια που μπορεί να είναι εξίσου δραστικά ή και περισσότερο (Veskoukis, Tsatsakis, and Kouretas 2011).

1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Η κατανάλωση οξυγόνου, ως απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη και τη διατήρηση της ζωής, συνεπάγεται τον αναπόφευκτο σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο τόσο στη φυσιολογία όσο και στην παθοφυσιολογία της αερόβιας ζωής. Με τον όρο Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) εκφράζονται μια γενική κατηγορία δραστικών ενώσεων που προκύπτουν ως ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου. Μάλιστα, αναφέρεται τόσο σε ελεύθερες ρίζες, όπως είναι η ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}) καθώς και σε μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Li et al., 2016).

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	
Ελεύθερες Ρίζες	
$O_2^{\bullet -}$	Ανιόν σουπεροξειδίου
OH^{\bullet}	Ρίζα υδροξυλίου
RO^{\bullet}	Ρίζα αλκοξυλίου
ROO^{\bullet}	Ρίζα υπεροξειδίου
Μη ελεύθερες ρίζες	
H_2O_2	Υπεροξείδιο υδρογόνου
$ROOH$	Οργανικά υδροπεροξείδια
1O_2	Μονήρες οξυγόνο
O_3	Όζον

Εικόνα 4: Δραστικές μορφές οξυγόνου

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει γίνει και στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια ίδιας στροφορμής στις εξωτερικές του υποστιβάδες, με αποτέλεσμα να θεωρείται εξ ορισμού ως διπλή ελεύθερη ρίζα. Η μορφή αυτή που ονομάζεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (triplet state) παρουσιάζει μικρή οξειδωτική ικανότητα. Αντίθετα, η αλλαγή στροφορμής και απόκτηση αντιπαράλληλης αυτοπεριστροφής των ηλεκτρονίων μετατρέπει το μονήρες οξυγόνο (singlet state) σε ισχυρό οξειδωτικό μέσο (Γάλαρης, 2016).

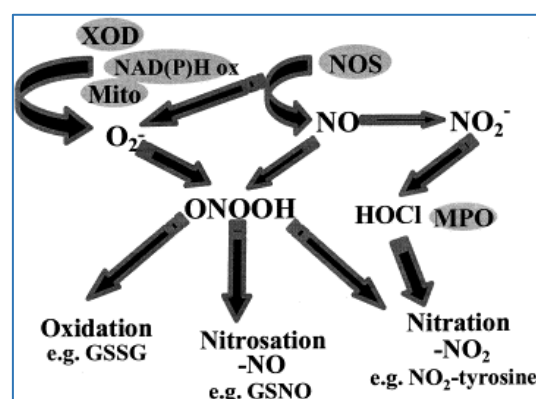
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου

Οι Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) αποτελούν μια οικογένεια ενώσεων που έχουν κοινή πρωτογενή πηγή το μονοξείδιο του αζώτου. Σε αυτό τον τύπο δραστικών μορφών ανήκουν ρίζες, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO^{\bullet}), το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^{\bullet}), καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δύνανται να προκαλέσουν οξείδωση άλλων μορίων ή να αποκτήσουν ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων και να μετατραπούν σε ρίζες, με κυριότερο παράδειγμα το νιτρώδες οξύ (HNO_2) και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ($ONOO^{\bullet -}$) (Giles et al. 2017).

Δραστικές Μορφές Αζώτου	
Ελεύθερες Ρίζες	
NO [•]	Μονοξειδίο αζώτου
NO ₂ [•]	Διοξειδίο αζώτου
Μη ελεύθερες ρίζες	
HNO ₂	Νιτρώδες Οξύ
ONOO ⁻	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν
ONOOH	Υπεροξυνιτρώδες οξύ

Εικόνα 5: Δραστικές μορφές αζώτου

Το μονοξειδίο του αζώτου το οποίο συγκαταλέγεται στην ευρύτερη κατηγορία των ελευθέρων ριζών διαφέρει ταυτόχρονα από αυτές και προσδιορίζεται σχετικά αδρανές, με δραστικότητα παρόμοια με εκείνη του οξυγόνου. Ωστόσο, οι φυσικοχημικές του ιδιότητες το καθιστούν καθοριστικό παράγοντα στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς ως μικρό, υδρόφοβο, ουδέτερου φορτίου μόριο μπορεί να διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Γάλαρης, 2016). Επίσης, η αντίδραση του με το ανιόν σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περοξυνιτρίτη (ONOO⁻) ο οποίος είναι ο κύριος διαμεσολαβητής της τοξικής του δράσης και προκαλεί αντιδράσεις οξειδωσης, νίτρωσης - προσθήκης NO₂[•], νιτροποίησης - προσθήκης NO⁺ και νιτροσυλίωσης σε βιολογικά μόρια (R. P. Patel et al. 1999).



Εικόνα 6: NO-εξαρτώμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου (R. P. Patel et al. 1999).

1.2.3 Δραστικές Μορφές Θείου και Χλωρίου

Το χημικό στοιχείο θείο θεωρείται κεντρικής σημασίας στην οξειδοαναγωγική βιολογία εξαιτίας της εμπλοκής του σε μεταβολικά μονοπάτια. Είναι συστατικό πολλών οργανικών μορίων, όπως είναι τα αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη και το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη, ενώ καθορίζει και τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων με κυριότερο παράδειγμα εκείνο της καταλάσης.

Στις Δραστικές Μορφές Θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) ταξινομούνται ενώσεις που περιέχουν άτομο θείου σε υψηλή οξειδωτική κατάσταση: ρίζαθειού (RS•), σουλφενικό (RSOH) και σουλφινικό οξύ (RSO₂H) και το δισουλφίδιο (RSSR)(Gruhlke and Slusarenko 2012).

Δραστικές Μορφές	
Θείου	
RSSR	Δισουλφίδιο
RSOH	Σουλφενικό οξύ
RSO ₂ H	Σουλφινικό οξύ
RS•	Ρίζαθειού
Χλωρίου	
HClO	Υποχλωριώδες οξύ
OCl ⁻	Υποχλωριώδες ανιόν
RNHCl	Χλωραμίνες

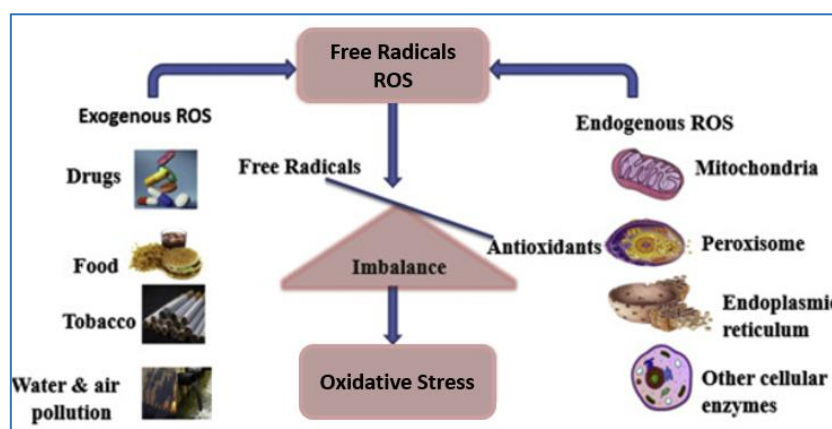
Εικόνα 7: Δραστικές μορφές θείου και χλωρίου

Οι Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) περιλαμβάνουν εκτός των άλλων και τις εξής ενώσεις: υποχλωριώδες οξύ (HClO), υποχλωριώδες ανιόν (OCl⁻) και χλωραμίνες (RNHCl). Το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) αποτελεί τη σημαντικότερη δραστική μορφή της οικογένειας και έναν εξαιρετικά ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα, που αλληλεπιδρά με θειολικές ομάδες, οξειδώνοντάς τις, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό συσσωμάτων. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να

χλωριώνει αμινικές ομάδες πρωτεϊνών, παράγοντας χλωραμίνες όπως και νουκλεοτίδια του DNA (R. Li, Jia, and Trush, n.d.).

1.3 Παραγωγή δραστικών μορφών *in vivo*

Ελεύθερες ρίζες και γενικότερα δραστικές μορφές παράγονται διαρκώς από τους ζώντες οργανισμούς ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και της απόκρισης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται μπορεί να είναι είτε ενζυμικές όπως αυτές της αναπνευστικής αλυσίδας, της φαγοκύτωσης και του κυτοχρώματος P-450 είτε μη ενζυμικές αλληλεπιδράσεις του οξυγόνου με οργανικές ενώσεις (Lobo et al. 2010).

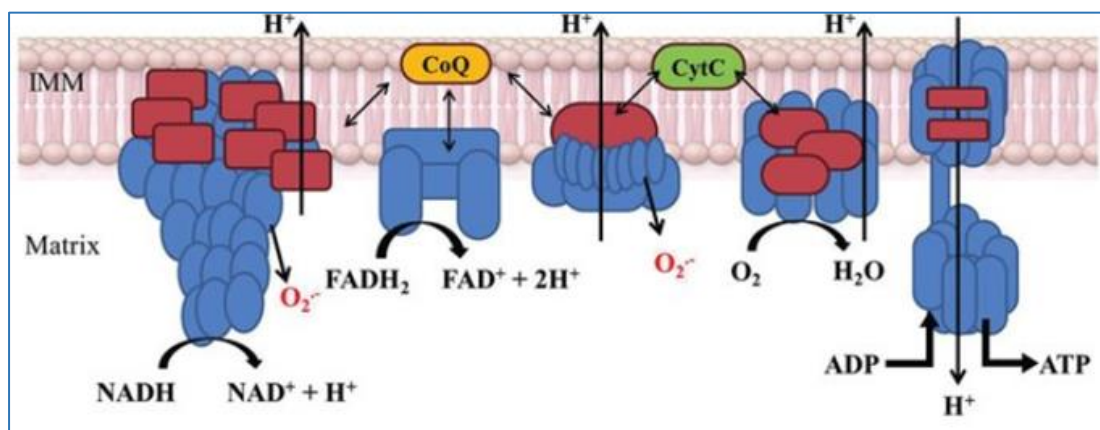


Εικόνα 8: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών, δραστικών μορφών οξυγόνου (Warraich, Hussain, and Kayani 2020).

❖ Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Η σημαντικότερη πηγή παραγωγής ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου είναι η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων προκειμένου να συντεθεί το 70% της ενέργειας (ATP) που απαιτούν οι αερόβιοι οργανισμοί. Κατά τη διάρκεια αυτής, συμβαίνει σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο (O_2) προκειμένου να αναχθεί

σε νερό (H_2O), διαδικασία που διαμεσολαβείται από φορείς ηλεκτρονίων που ονομάζονται αναπνευστική αλυσίδα (σύμπλοκο NADH δεϋδρογενάσης(I), σύμπλοκο αναγωγής κυτοχρώματος c(III), σύμπλοκο οξειδάσης κυτοχρώματος c(IV) και ουβικινόνη, κυτόχρωμα c). Αρχικός δότης ηλεκτρονίων αποτελούν τα μόρια NADH και $FADH_2$, τα οποία προκύπτουν από τη γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs και είναι επιφορτισμένα με ένα ζεύγος ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού μεταφοράς, το οποίο με την οξείδωσή τους εισέρχεται στην αλυσίδα μεταφοράς. Ωστόσο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ένα μικρό ποσοστό των ηλεκτρονίων (0.2-2%) διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και αντιδρούν απευθείας με το οξυγόνο, παράγοντας ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) και/ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Υπεύθυνες θέσεις για αυτή τη διαρροή θεωρούνται τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα I και III. Επίσης, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O_2^- και στο H_2O_2 σχηματίζεται μια ακόμη ρίζα, εκείνη του υδροξυλίου ($OH\cdot$). Βλάβες, ωστόσο, στη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να ευνοήσουν τη διαρροή ηλεκτρονίων προς το O_2 και την επακόλουθη δημιουργία O_2^- , με αποτέλεσμα να παράγονται περισσότερες δραστικές μορφές συγκριτικά με τη φυσιολογική κατάσταση (N. Παπαγαλάνης, 2014; Zhao et al. 2019).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής ROS κατά την οξειδωτική φωσφορύλιση (Stojković and Dorđević, 2017).

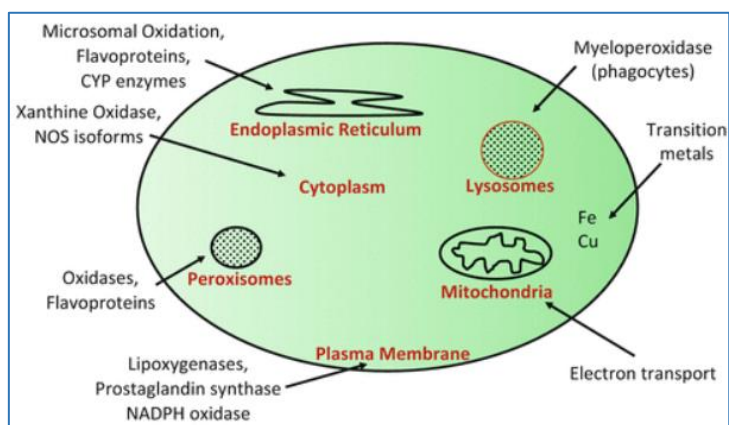
Το 95% του καταναλισκόμενου από τον οργανισμό οξυγόνου αξιοποιείται στην παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια. Το υπόλοιπο 5% το οποίο δεν χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP, αποτελεί υπόστρωμα ενζυμικών αντιδράσεων

στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ενζυμικά συστήματα NADH οξειδάση, οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, οξειδάση της ξανθίνης, κυκλοξυγενάση και λιποξυγενάση ανάγουν ατελώς το μοριακό οξυγόνο με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου, δημιουργώντας ενδιάμεσα οξειδωτικά προϊόντα με σειρά παραγωγής O_2^- , H_2O_2 και $OH\cdot$ (Auten and Davis 2009; Dröge 2002; Valko et al. 2007; Ν. Παπαγαλάνης, 2014).

Επόμενος μηχανισμός παραγωγής δραστικών ειδών αποτελεί η φαγοκυττάρωση ως απόκριση σε εξωγενείς παράγοντες όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Ο κυρίαρχος φαγοκυτταρικός πληθυσμός του αίματος, τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα σε συνδυασμό με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, απαντώντας σε χημειοτακτικά ερεθίσματα των κατεστραμμένων κυττάρων, μεταναστεύουν στην περιοχή της μόλυνσης ή του τραύματος, προκειμένου να αντιμετωπιστεί η κατάσταση. Η πρόσδεση αντιγόνων των παθογόνων μικροοργανισμών σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων συνεπάγεται μια ακολουθία κυτταρικών οδών σηματοδότησης, τμήμα της οποίας είναι και η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης 2, ενός ενζύμου που είναι σε αδρανή μορφή υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης προκύπτει η κατάλυση της αντίδρασης μεταφοράς ηλεκτρονίου από το NADPH στο οξυγόνο, παράγοντας τη ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^-) (Magnani and Mattevi, 2019). Μάλιστα, τα φαγοκύτταρα όταν διεγερθούν, αυξάνουν δραματικά την κατανάλωση οξυγόνου (μέχρι και 100 φορές), αυξάνοντας κατ'έπекταση και την παραγωγή της ρίζας O_2^- σε αντίστοιχο επίπεδο, φαινόμενο γνωστό με τον όρο “αναπνευστική ή οξειδωτική έκρηξη” (Babior 2000). Εν συνεχεία, το παραγόμενο ως υποπροϊόν O_2^- υφίσταται αυθόρμητη ή ενζυμική αντίδραση (κατάλυση από SOD) και μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο μέσω του μηχανισμού Fenton μπορεί να δημιουργήσει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$) (Lawrenz et al. 2017). Ωστόσο, τα δραστικά είδη O_2^- και H_2O_2 δεν είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και δεν επαρκούν για την αποτελεσματική εξουδετέρωση παθογόνων. Για το σκοπό αυτό, απελευθερώνονται και κυστίδια που περιέχουν εκ των άλλων και το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO), μια αιμοπρωτεΐνη που χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το H_2O_2 , οξειδώνει ιόντα χλωρίου παράγοντας υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) σε ουδέτερο ή χαμηλό pH, το οποίο πιστεύεται ότι ενισχύει την άμυνα (Hampton, Kettle, and Winterbourn 1998).

Ακόμη, σημαντική είναι και η συνεισφορά των υπεροξειδιοσωμάτων στο σχηματισμό και στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών (Bonekamp et al. 2009). Τα υπεροξειδιοσώματα είναι ιδιαίτερα μεταβολικά ενεργά οργανίδια που διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα, τις οξειδάσες, υπεύθυνες για τη διάσπαση ποικίλων υποστρωμάτων όπως λιπαρά οξέα, πουρίνες κ.α. προς παραγωγή H_2O_2 (Angermüller, Islinger, and Völkl 2009). Επίσης, σε αυτά απαντάται και η καταλάση, ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ένζυμα αποικοδόμησης του H_2O_2 (Fransen, Lismont, and Walton 2017).

Τέλος, είναι γνωστό πως ιόντα ορισμένων μετάλλων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός συμβάλλουν στα ενδογενή επίπεδα ROS. Μία από τις πιο γνωστές αντιδράσεις είναι η Fenton, κατά την οποία ένα μέταλλο μετάπτωσης αντιδρά με το H_2O_2 παράγοντας $OH\cdot$ και ένα ιόν οξειδωμένου μετάλλου. Ακολούθως, κατά την αντίδραση Haber–Weiss, η οξειδωμένη μορφή του μετάλλου ανάγεται από το $O_2^{\cdot-}$ και η ανηγμένη μορφή που προκύπτει αλληλεπιδρά με H_2O_2 δημιουργώντας επίσης $OH\cdot$ (Leonard, Harris, and Shi 2004). Επιπλέον, ορισμένα μεταλλικά ιόντα μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με κυτταρικά μόρια και να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες ή να επάγουν μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Παραδείγματος χάριν, το χρώμιο αντιδρά με κυστεΐνη ή πενικιλλαμίνη παράγοντας ρίζες θειόλης, που δύνανται να προκαλέσουν άμεση κυτταρική βλάβη ή να αντιδράσουν με άλλα μόρια θειόλης και να σχηματίσουν $O_2^{\cdot-}$ (Shi et al. 1994).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της ενδογενούς παραγωγής ROS (Dhawan 2014).

❖ Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Ελεύθερες ρίζες είναι δυνατό να παραχθούν και εξαιτίας της έκθεσης σε εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η υπεριώδης και ιονίζουσα ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, ο καπνός του τσιγάρου και τα απόβλητα βιομηχανιών (Koren 1995). Επιπρόσθετα, σπουδαία πηγή οξειδωτικών θεωρείται και η διατροφή και πιο συγκεκριμένα η κατάποση λιπαρών τροφών, καπνιστού κρέατος και η μαγειρική με χρησιμοποιημένο λάδι (Bn 1986; Phaniendra, Jestadi, and Periyasamy 2015). Τέλος, δραστικές μορφές παράγονται και από την πρόσληψη ορισμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Για παράδειγμα, μπορεί κατά το μεταβολισμό ενός φαρμάκου να προκύψουν οξειδωτικά ενδιάμεσα όπως συμβαίνει με τη δοξορουβικίνη ή να παρατηρηθεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία λόγω οξειδωτικού στρες, γεγονός που έχει συσχετιστεί με μακροχρόνια χορήγηση αζιδοθυμιδίνης (Deavall et al. 2012).

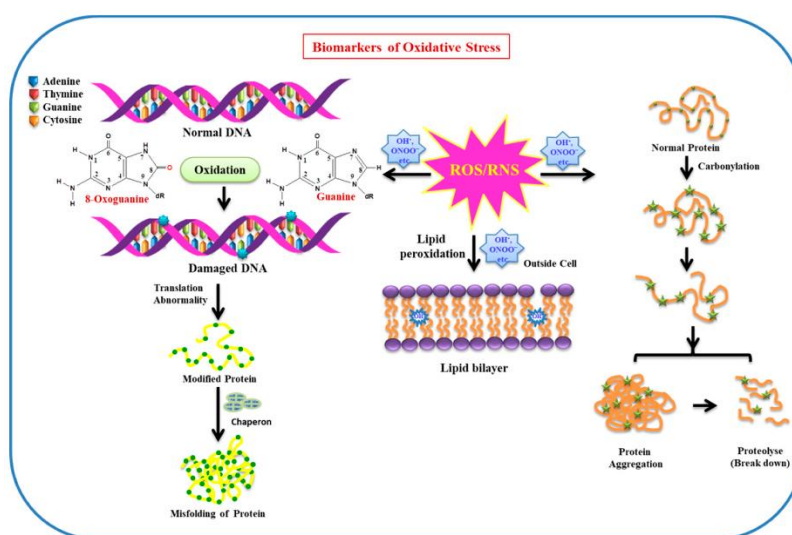
1.4 Βιολογικές λειτουργίες ελευθέρων ριζών

1.4.1 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Παρά τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών που παρατηρούνται σε υψηλά επίπεδα αυτών, έχει αποδειχθεί πως οι χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις έχουν θετικό αντίκτυπο στον οργανισμό συμβάλλοντας στην ομοίωσή του. Αρχικά, αξιοσημείωτος θεωρείται ο ρόλος τους στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς εξουδετερώνουν τα παθογόνα μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης (Pizzino et al. 2017). Επιπλέον, συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια σε ενδοκυτταρικό και διακυτταρικό επίπεδο. Ειδικότερα, εμπλέκονται στη σηματοδότηση MAP κινασών, φωσφατασών τυροσίνης, ενώ στόχοι τους αποτελούν και οι γνωστοί μεταγραφικοί παράγοντες Nrf2, NF-κB (Kamata and Hirata 1999; R. Patel et al. 2017). Επίσης, συμμετέχουν και σε θεμελιώδεις βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων όπως είναι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και ο μεταβολισμός (Mittler 2017).

1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών επιφέρει επιβλαβείς συνέπειες στην κυτταρική λειτουργία, καθώς η ανεξέλεγκτη οξειδωτική τους δράση επηρεάζει βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία θέτοντας σε κίνδυνο ακόμη και τη βιωσιμότητά τους (Viña et al. 2000). Η αλληλεπίδραση τους με λιπίδια, πρωτεΐνες και δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) επιφέρει τροποποίηση της δομής ή ακόμη και καταστροφή τους, με αποτέλεσμα η λειτουργικότητά τους να μεταβάλλεται ή να χάνεται πλήρως (Halliwell 2005).

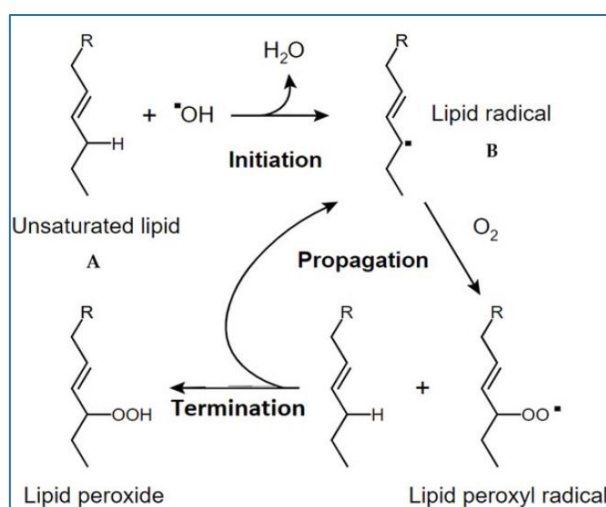


Εικόνα 11: Επίδραση ROS/RNS σε βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) (Singh et al. 2019).

❖ Επιδράσεις στα λιπίδια

Η λιπιδική υπεροξειδωση, ως αποτέλεσμα επίδρασης των ελευθέρων ριζών στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου της στην κυτταρική βιολογία και την ανθρώπινη υγεία. Στόχος της οξειδωσης αποδεικνύεται να είναι λιπίδια με διπλό δεσμό μεταξύ ατόμων άνθρακα στη δομή τους και πιο συγκεκριμένα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014). Δραστικές μορφές οξυγόνου προσβάλλουν κατάλοιπα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου με αποτέλεσμα να παράγεται μια

ελεύθερη λιπιδική ρίζα ($L\cdot$). Εν συνεχεία, η ασταθής φύση της παραγόμενης ρίζας οδηγεί στον ανασυνδυασμό της με ηλεκτρόνια παρακείμενων διπλών δεσμών και τη δημιουργία μιας σταθερότερης ρίζας που δύναται να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας μια ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου ($LOO\cdot$). Αυτές οι ρίζες θα σχηματίσουν εκ νέου ρίζες, επάγοντας μια αλυσιδωτή αντίδραση οξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, η οποία θα τερματιστεί όταν προκύψει μη δραστικό προϊόν (Juan et al. 2021). Έτσι, η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (Yin, Xu, and Porter 2011).



Εικόνα 12: Αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης (González-Minero, Bravo-Díaz, and Ayala-Gómez 2020).

Στην υπεροξειδωση λιπιδίων, εκτός από τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία ($LOOH$) είναι δυνατό να προκύψουν και δευτερογενή προϊόντα, όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυενεβάλη (4-HNE), που θεωρούνται ως το πιο μεταλλαξιογόνο και τοξικό προϊόν της διαδικασίας αντίστοιχα (Esterbauer et al. 1990).

Γενικότερα, η συγκεκριμένη οξειδωτική βλάβη κρίνεται ως πολύ σημαντική in vivo, αφού συνεπάγεται απώλεια λειτουργικότητας της μεμβράνης (μείωση της ρευστότητας, αύξηση διαπερατότητας σε Ca^{2+} και H^+) και αδρανοποίηση ενζύμων και υποδοχέων που είναι δεσμευμένοι σε αυτή (Phaniendra, Jestadi, and Periyasamy 2015).

❖ Επιδράσεις στα νουκλεϊκά οξέα

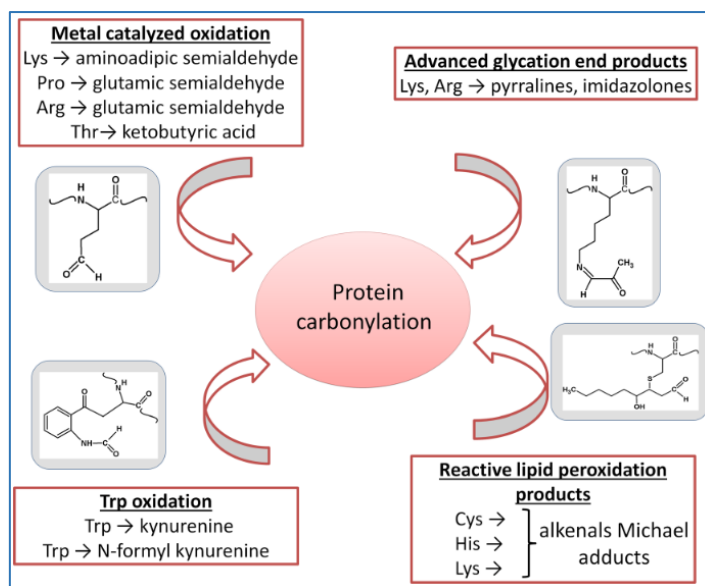
Επόμενος οξειδωτικός στόχος των ελευθέρων ριζών είναι τα νουκλεϊκά οξέα. Το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) θεωρείται περισσότερο ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη

συγκριτικά με το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), καθώς η μονόκλωνη φύση του το καθιστά πιο ασταθές, ενώ μεταξύ των μορίων DNA, το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο επιρρεπές σε σχέση με το πυρηνικό, καθώς εντοπίζεται σε κοντινότερη απόσταση από το σημείο παραγωγής των ROS (Phaniendra, Jestadi, and Periyasamy 2015). Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις που υφίστανται οφείλονται ως επί το πλείστον στη ρίζα υδροξυλίου, η δράση της οποίας επιφέρει μονόκλωνα ή και δίκλωνα θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA, τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων αλλά και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης ενδεχομένων λαθών. Έτσι, η τροποποίηση του γενετικού υλικού μπορεί να αποτελέσει το πρώτο βήμα στην πρόκληση μεταλλάξεων, στην καρκινογένεση και στην εμφάνιση κληρονομικών ασθενειών (Juan et al. 2021).

Ακόμη, έχει μελετηθεί πως οι πυριμιδίνες, δηλαδή οι αζωτούχες βάσεις θυμίνη και κυτοσίνη, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, είναι εφικτό να συμβεί απομάκρυνση αυτών με συγκεκριμένους μηχανισμούς και αντικατάσταση από μη οξειδωμένες βάσεις (Rudling et al. 2017).

❖ **Επιδράσεις στις πρωτεΐνες**

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει και στην οξείδωση που υφίστανται τα αμινοξέα και τα πρωτεϊνικά μόρια, που προκαλεί τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων, διάσπαση πεπτιδικού δεσμού ή σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας και κατ'επέκταση σχηματισμό συσσωμάτων. Σε γενικότερο επίπεδο, παρατηρείται σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης, γεγονός που θα οδηγήσει σε μεταβολή ή απώλεια της λειτουργικότητας ενζύμων, υποδοχέων και διαμεμβρανικών φορέων (Butterfield et al. 1998). Κύριοι στόχοι των ελευθέρων ριζών είναι τα αμινοξέα, εκ των οποίων πιο ευπαθή είναι η λυσίνη, θρεονίνη, προλίνη και αργινίνη, τα οποία μετατρέπονται σε αλδεϋδικές και κετονικές ομάδες, καθώς και οι θειολικές ομάδες του καταλοίπου της κυστεΐνης, που θα οξειδωθούν σε θειολικές ρίζες (RS•) και θα δημιουργηθούν τελικά είτε πιο δραστικές ρίζες είτε δισουλφιδικός δεσμός (Salvi et al. 2001). Επίσης, παρατηρείται σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων που αποτελεί ενδεικτικό δείκτη για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες και την ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής καταστροφής (Levine, Moskovitz, and Stadtman 2000).



Εικόνα 13: Κύρια μονοπάτια σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων, (i) μέσω οξείδωσης καταλύομενης από μέταλλο στις πλευρικές αλυσίδες Lys, Pro, Arg και Thr, (ii) με απευθείας οξείδωση σε Trp, (iii) ως προϊόντα προσθήκης προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε Lys και Arg, και (iv) αντίδρασης προϊόντων υπεροξείδωσης λιπιδίων με Cys, His και Lys (Fedorova, Bollineni, and Hoffmann 2014).

Προκειμένου να αποφευχθεί η εκδήλωση βλάβης θα ήταν σκόπιμο οι οξειδωμένες πρωτεΐνες να υδρολύονται ή να υποβάλλονται σε επεξεργασία από το πρωτεάσωμα, ώστε να μην επιτραπεί η διάχυση τους στο μεταβολικό δίκτυο ή η αλληλεπίδρασή με άλλες πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, αφού οι ROS μεταβάλλουν επίσης τα δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, οδηγώντας σε συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Szweda, Friguet, and Szweda 2002).

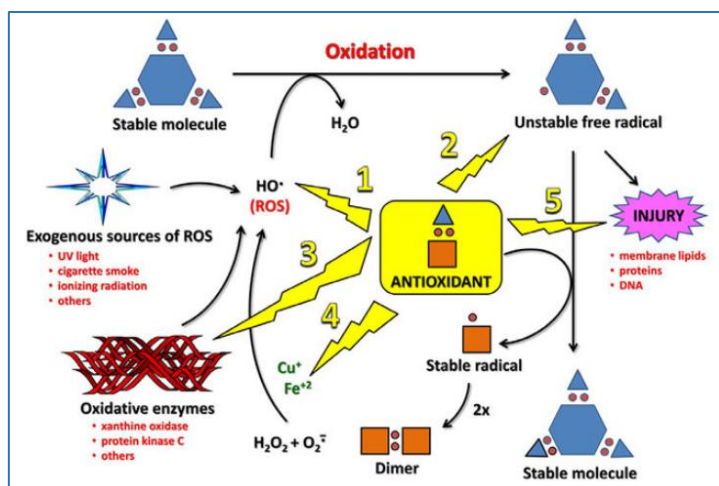
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Η συνεχής παραγωγή ελευθέρων ριζών και η ανάγκη προστασίας των κυττάρων από την οξειδωτική καταστροφή, επέβαλε στους αερόβιους οργανισμούς να αναπτύξουν ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκειμένου να ελέγχουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα στρες και να επιβιώνουν. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί «οποιαδήποτε ουσία, η παρουσία της οποίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, μπορεί να καθυστερήσει, αναστείλει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» (Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge). Για τον χαρακτηρισμό

όμως μιας ουσίας ως αντιοξειδωτική θα πρέπει να είναι γνωστές οι συνθήκες και η συγκέντρωση δράσης της (Veskoukis, Tsatsakis, and Kouretas 2011).

Εναλλακτικά, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που δύναται να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες ή άμεσα αντιδρώντας με αυτές ή έμμεσα εμποδίζοντας την παραγωγή δραστικών ειδών ή/και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα (Halliwell 2003). Πιο συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί δράσης μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής (de Oliveira Silva and Batista 2017):

- I. Άμεση εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών ως δότες ηλεκτρονίων, διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής οξειδωτικών μορίων.
- II. Ανάκτηση σταθερών μορίων με τη δωρεά ατόμων υδρογόνου, μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά προϊόντα.
- III. Αναστολή δράσης οξειδωτικών ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, μειώνοντας την παραγωγή δραστικών μορφών.
- IV. Περιορισμός της διαθεσιμότητας χηλικών μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου και χαλκού), τα οποία λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά και μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss οδηγούν στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ριζών,
- V. Επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών σε σημαντικά βιομόρια (μεμβρανικά λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA).

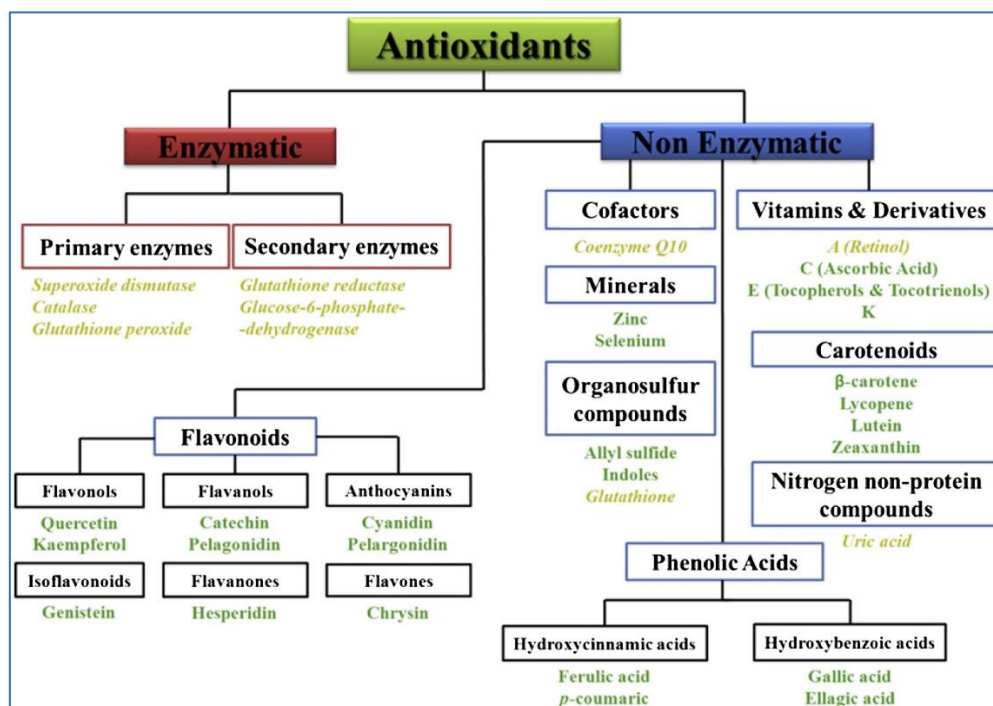


Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών (de Oliveira Silva and Batista 2017).

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι η δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να αφορά αποκλειστικά την περίσσεια οξειδωτικών μορίων και όχι όλων των παραγόμενων

ελευθέρων ριζών, ώστε να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση χωρίς όμως να διαταράσσονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται.

Αναφορικά με τη διάκριση τους, κατηγοριοποιούνται με βάση α) την προέλευσή: σε ενδογενή και εξωγενή, β) τις φυσικές ιδιότητες: σε υδρόφιλα και λιπόφιλα, γ) τη χημική φύση: ενζυμικά και μη.



Εικόνα 15: Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών (Ali et al. 2020).

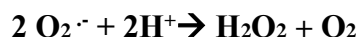
1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας διακρίνονται σε πρωτογενείς, που αδρανοποιούν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες (υπεροξειδική δισμουτάση -SOD, καταλάση -CAT και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης -GPx) και σε δευτερογενείς, που δρουν έμμεσα υποστηρίζοντας άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά (αναγωγή της γλουταθειόνης -GR) (Sharifi-Rad et al. 2020).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Πρόκειται για μέταλλο-ένζυμο, πρώτης γραμμής σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, το οποίο καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου,

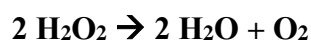
εξουδετερώνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες του $O_2^{\bullet-}$. Στη συνέχεια, το H_2O_2 μπορεί να απομακρυνθεί από άλλα ενζυμικά συστήματα (Ighodaro and Akinloye 2018):



Το εν λόγω ένζυμο απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων. Στα θηλαστικά συναντώνται τρεις μορφές SOD: Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, Mn-SOD στα μιτοχόνδρια και μια μικρή ποσότητα CuZn-SOD, η οποία βρίσκεται στο εξωκυτταρικό υγρό. Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\bullet-}$ παράγεται στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και ανάγεται από την μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτοσόλιο όπου και ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD.

Καταλάση (CAT)

Είναι μια τετραμερής αιμοπρωτεΐνη που δρα ως καταλύτης της αντίδρασης εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς νερό και μοριακό οξυγόνο, σύμφωνα με την αντίδραση:



Είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιδιαίτερα στα υπεροξειδιοσωμάτια, στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα (Magnani and Mattevi 2019).

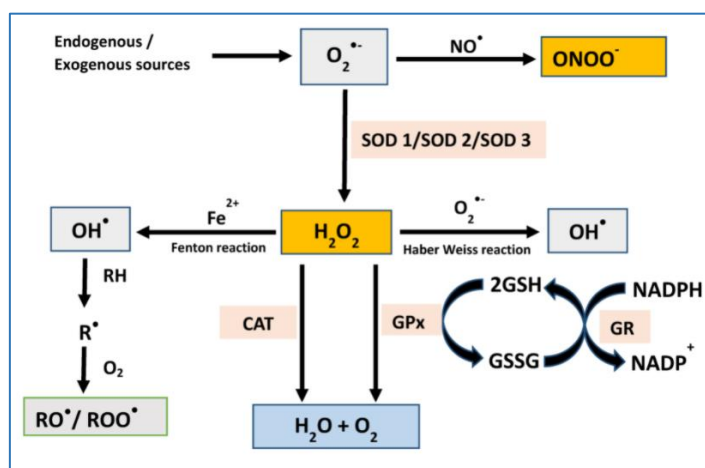
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Είναι μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα το ιχνοστοιχείο σελήνιο, απαραίτητο για την ενζυμική της δράση. Η κυριότερη αντίδρασή στην οποία συμμετέχει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αφορά τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O , με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH), όπως αναγράφεται παρακάτω (Margis et al. 2008):



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανοιγμένη της μορφή (GSH) και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH (Couto, Wood, and Barber 2016).



Εικόνα 16: Σύνοψη δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ajuwon, Marnewick, and Davids 2015).

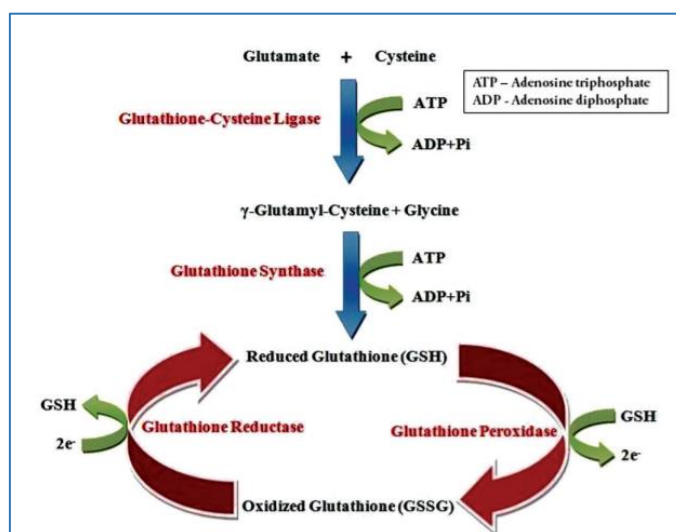
1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

❖ Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο, μη ενζυμικό, ενδογενές αντιοξειδωτικό των κυττάρων, καθώς απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Πρόκειται για ένα μικρού μοριακού βάρους τριπεπίδιο (1-γλουταμινικό οξύ, 1-κυστεΐνη, γλυκίνη) και οφείλει την αντιοξειδωτική του δράση στη σουλφυδρυλική ομάδα του καταλοίπου της κυστεΐνης, που ως δότης πρωτονίων προκαλεί αναγωγή οξειδωτικών μορίων (Lobo et al. 2010).

Ενδοκυτταρικά, συναντάται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (GSH), ενώ ένα μικρό ποσοστό, μόλις 5%, μπορεί να οξειδωθεί και να σχηματίσει το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) μέσω αντίδρασης με δεύτερο μόριο γλουταθειόνης ή άλλες θειόλες (Lu 2013; Ribas, García-Ruiz, and Fernández-Checa 2014). Σε κατάσταση που επικρατεί οξειδοαναγωγική ισορροπία, η αναλογία GSH/GSSG διατηρείται σταθερή. Ωστόσο, σε συνθήκες υπερπαραγωγής ελευθέρων ριζών, τροποποιείται το δυναμικό οξειδοαναγωγής είτε λόγω μείωσης των επιπέδων GSH είτε/ και λόγω αυξημένης παραγωγής GSSG, προκαλώντας γονιδιακή ενεργοποίηση και σύνθεση πρωτεϊνών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (π.χ. υπεροξειδάσες γλουταθειόνης) (Gaucher et al., n.d.). Η ανηγμένη μορφή αποκαθίσταται τελικά με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (Lu 2013).

Τέλος, ένας ακόμη μηχανισμός προστατευτικής δράσης αφορά την αλληλεπίδραση με άλλα αντιοξειδωτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βιταμίνη E, της οποίας η οξειδωμένη μορφή ανάγεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης που χρησιμοποιεί GSH ως υπόστρωμα (Forman, Zhang, and Rinna 2009).



Εικόνα 17: Αντιδράσεις κύκλου οξειδοαναγωγής γλουταθειόνης (Sonthalia, Daulatabad, and Sarkar 2016).

❖ Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C (1- ασκορβικό οξύ) έχει αποδειχθεί ως εξαιρετικά αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό μόριο, το οποίο χάρη στην υδατοδιαλυτή του φύση,

μπορεί να δρα εντός και εκτός των κυττάρων, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες (Pehlivan 2017). Δρα ως δότης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σε δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (όπως ρίζα υδροξυλίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου), παράγοντας ένα σταθερότερο μόριο (Pizzino et al. 2017). Ακόμη, είναι αποτελεσματική στην αναγέννηση της μη οξειδωμένης μορφής της βιταμίνης E, ανάγοντας τις ρίζες τοκοφεροξυλίου. Αυτή η διαδικασία προστατεύει τις μεμβράνες και άλλα διαμερίσματα του κυττάρου από βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (Pehlivan 2017).

Η συγκεκριμένη βιταμίνη δεν είναι δυνατό να συντεθεί ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό εξαιτίας μετάλλαξης στο τελευταίο γονίδιο που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Για αυτό είναι απαραίτητο να προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής από φυτικά προϊόντα που την περιέχουν σε υψηλή συγκέντρωση (Akram, Shafiq, and Ashraf 2017).

❖ Βιταμίνη E

Ο όρος βιταμίνη E εμπερικλείει ένα σύνολο λιπόφιλων μορίων τοκοφερόλης και τοκοτριενόλης που συντίθενται από φυτικούς οργανισμούς και περιέχονται σε βρώσιμα έλαια και σπόρους, καθώς και σε τρόφιμα τεχνητά εμπλουτισμένα (Sundl et al. 2007). Μεταξύ αυτών, η α-τοκοφερόλη παρουσιάζει περισσότερο ενδιαφέρον, καθώς έχει την υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα που εξουδετερώνει ενδιάμεσες λιπιδικές ρίζες, προστατεύοντας τη μεμβράνη από λιπιδική υπεροξειδωση (Traber and Atkinson 2007).

❖ Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον με την αποκάλυψη πως αυξημένη διατροφική κατανάλωση αυτών συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο για αρκετές εκφυλιστικές διαταραχές (π.χ. διάφοροι τύποι καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις), και μάλιστα ο μηχανισμός προστασίας αποδείχτηκε πως αφορούσε την προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη (Mayne 1996).

Αποτελούν φυσικές χρωστικές ουσίες που συντίθενται από φυτικά κύτταρα και σε ορισμένα βακτήρια, φύκη, μύκητες και προσλαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω

της διατροφής, με την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών κόκκινου, κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος (Stahl and Sies 2003). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών υπεροξυλίου και μονήρους οξυγόνου, χάρη στο σύστημα των συζευγμένων διπλών δεσμών που υπάρχει στη δομή τους (Srivastava 123AD). Επίσης, έχει παρατηρηθεί και συνεργιστική δράση τους με άλλα αντιοξειδωτικά. Πιο συγκεκριμένα, το β-καροτένιο, το οποίο θεωρείται ιδιαίτερα ισχυρό αντιοξειδωτικό, αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και με το σελήνιο (Stahl and Sies 2003).

❖ Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινολικές ενώσεις παράγονται ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών προκειμένου να ενισχυθεί η άμυνα τους σε εξωτερικούς παράγοντες (Kouka et al. 2019), ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό εισέρχονται με την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και ροφημάτων όπως τσάι και καφές.

Είναι γνωστά αντιοξειδωτικά μόρια, που σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότες ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου, καταστέλλοντας την αλυσιδωτή οξειδωτική αντίδραση και την εξάπλωση τους. Επιπλέον, με τη χηλίωση μετάλλων μετάβασης, όπως ο σίδηρος II (Fe^{2+}), μειώνουν την εμφάνιση της αντίδρασης Fenton που παράγει εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου και υπεροξυλίου (Zhang and Tsao 2016).

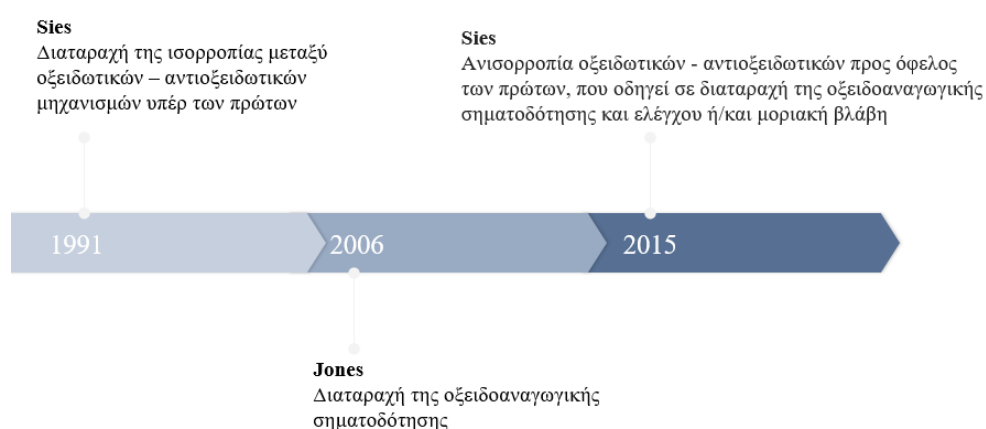
❖ Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q (CoQ, ουβικινόνη) είναι ένα μικρό, λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που παράγεται *de novo* στους αερόβιους οργανισμούς και δρα ως συμπαραγοντας στην αναπνευστική αλυσίδα, στη σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που εμπλέκονται στη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Hernández-Camacho et al. 2018). Η αντιοξειδωτική δράση που ασκεί είναι είτε άμεση εξουδετερώνοντας ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Littarru and Tiano 2007).

❖ Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν αποικοδόμησης των πουρινών και θεωρείται κρίσιμης σημασίας αντιοξειδωτικό του πλάσματος, δρώντας έναντι των ριζών υπεροξυλίου, O₂, HOCL, και ONOO (Sautin and Johnson 2008).

1.6 Οξειδωτικό στρες

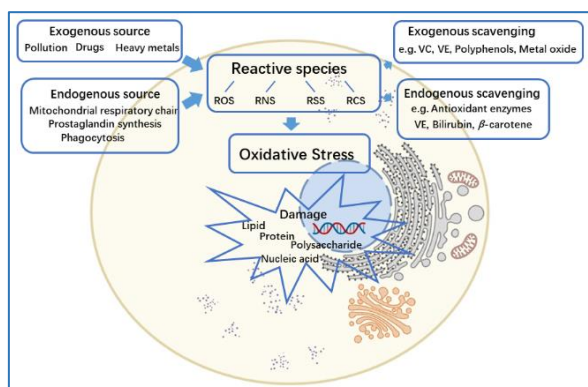


Εικόνα 18: Ορισμοί οξειδωτικού στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες διατυπώθηκε από τον Helmut Sies το 1991 ως «διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων». Η ανισορροπία αυτή αφορά την παραγωγή δραστικών ειδών (κυρίως οξυγόνου και αζώτου) και την ικανότητα του οργανισμού να τα εξουδετερώσει και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών είτε σε μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα είτε σε συνδυασμό αυτών (Sies 1991).

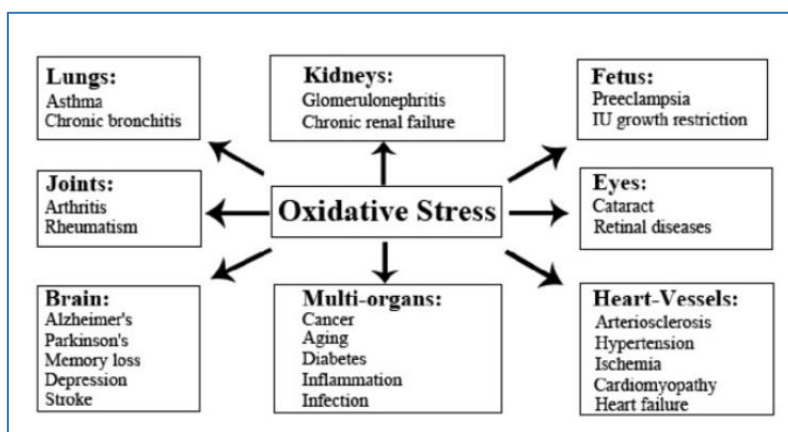
Το 2006, ο Dean Jones εισήγαγε έναν νέο ορισμό στην επιστημονική κοινότητα, εκείνον της διαταραχής της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Jones 2006). Το 2015, ο Helmut Sies επαναδιατύπωσε το οξειδωτικό στρες με πιο ακριβή τρόπο ως «διαταραχή προ-οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη»(Sies 2015). Συνέπεια αυτής της αναθεώρησης είναι η άρρηκτη σύνδεση του οξειδωτικού στρες με τη διατάραξη φυσιολογικών σηματοδοτικών

μονοπατιών και ομοιόστασης καθώς και με βλάβη μακρομορίων (Veskoukis et al., 2011).



Εικόνα 19: Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών (Hernández-Camacho et al. 2018) (Oxidative Stress et al. 2021).

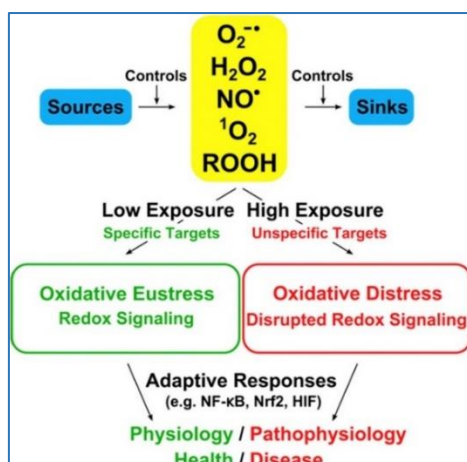
Εξαρχής, το οξειδωτικό στρες θεωρήθηκε ως επιζήμιο φαινόμενο για τον οργανισμό, αφού συσχετίστηκε με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων είτε ως αιτία είτε ως αποτέλεσμα. Ειδικότερα, επιβεβαιώθηκε ότι συμβάλλει στην παθογένεση και παθοφυσιολογία χρόνιων προβλημάτων υγείας όπως νευροεκφυλιστικές νόσοι (Alzheimer, Parkinson), καρδιαγγειακές ασθένειες και φλεγμονές, σακχαρώδης διαβήτης καθώς και καρκίνος (Pisoschi and Pop 2015).



Εικόνα 20: Οξειδωτικό στρες και επαγόμενες ασθένειες (Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health n.d.,2021).

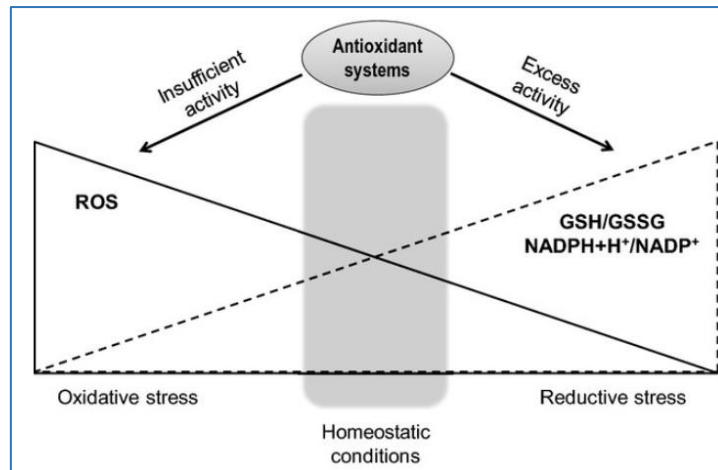
Ωστόσο, τελευταία έχει αποδειχτεί πως τα δραστικά είδη έχουν και ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό και ως φυσιολογικά προϊόντα του μεταβολισμού ρυθμίζουν κυτταρικές διεργασίες. Αυτό συμβαίνει διότι η βιολογία των ελευθέρων ριζών

ακολουθεί το φαινόμενο της όρμησης (hormesis), σύμφωνα με το οποίο στρεσογόνοι παράγοντες επάγουν προσαρμοστική, αμυντική απόκριση μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση. Έτσι, χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες οδηγούν σε έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, πρωτεϊνών και ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών, προάγοντας τη μεταβολική υγεία. Υπό αυτή την έννοια, προκύπτει το οξειδωτικό εύστρες (Niki 2016).



Εικόνα 21: Οξειδωτικό στρες και οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Sies 2018).

Βέβαια, εκτός από το οξειδωτικό στρες, το οποίο έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα εκτενώς, υπάρχει και το αναγωγικό στρες. Αναφορικά με αυτόν τον τύπο στρες, δεν υπάρχει εξίσου ερευνητικό ενδιαφέρον, με τον όρο να αναφέρεται αρχικώς το 1987 από τον Albert Wendel, χωρίς ακόμη να έχει διευκρινιστεί πλήρως. Εξ ορισμού του οξειδωτικού στρες, το αναγωγικό στρες μπορεί να ερμηνευτεί ως την κατάσταση του οργανισμού κατά την οποία τα κύτταρα ή τα οργανίδια βρίσκονται σε περισσότερο αναγωγική κατάσταση απ' ότι συμβαίνει φυσιολογικά. Πιθανά αίτια θεωρούνται η υποξία και η αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας που συνεπάγονται μειωμένη παραγωγή δραστικών ειδών σε σχέση με την αντιοξειδωτική άμυνα (Veskoukis, Tsatsakis, and Kouretas 2011).



Εικόνα 22: Οξειδωτικό και αναγωγικό στρες (Bellezza et al. 2020).

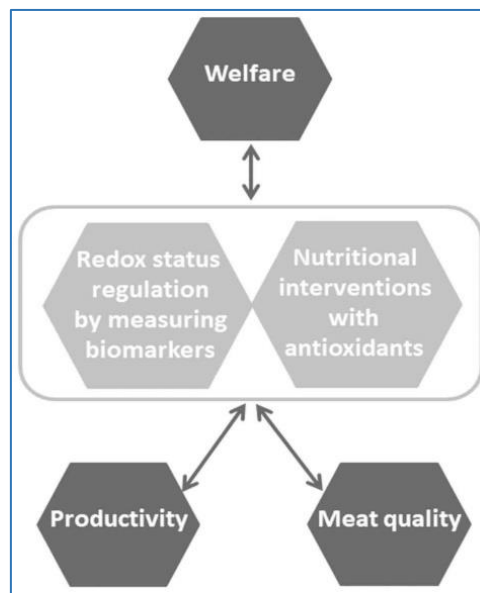
1.7 Οξειδωτικό στρες και παθογένεια ζώων

Έχει αποδειχθεί πως η παθογένεση πολλών ασθενειών, κοινών στα παραγωγικά ζώα, όπως μαστίτιδα, εντερίτιδα και σήψη, σχετίζεται με διαταραχές της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης, και πιο συγκεκριμένα με οξειδωτικές τροποποιήσεις σημαντικών βιομορίων (λιπιδίων, DNA μορίων, πρωτεϊνών) (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Μάλιστα, η οξείδωση πρωτεϊνικών μορίων έχει προταθεί ως δείκτης μόλυνσεων επαγόμενων από βακτήρια, ιούς και παράσιτα που οδηγεί παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της ανοσογονικότητας (Celi and Gabai 2015).

Γενικότερα, οι στρεσογόνοι παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν την ευζωία κατηγοριοποιούνται ως εξής: φυσικοί, χημικοί, ψυχολογικοί και βιολογικοί. Διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, μηχανικοί τραυματισμοί, διαβίωση σε συνθήκες έλλειψης φωτός ή αέρα, υπερπληθυσμός ζώων, κακή διατροφή, μικροβιακές και ιογενείς λοιμώξεις, κ.λπ., συμβάλλουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και εν συνεχεία, επηρεάζουν την παραγωγική και αναπαραγωγική απόδοση, θέτοντας σε κίνδυνο ακόμη και την υγεία των ζώων (Surai et al. 2019).

Έτσι, προκύπτει πως η βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των παραγωγικών ζώων μέσω συμπλήρωσης της διατροφής με φυσικά αντιοξειδωτικά συνιστά μια οικονομική, μη φαρμακευτική αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και

της πρόληψης ασθενειών, ενώ προτείνεται πως συμβάλλει στην παράταση του προσδόκιμου χρόνου ζωής. Ακόμη, οδηγεί στη παραγωγή ανώτερης ποιότητας κρέατος και γάλακτος (Castillo et al. 2013)(Abuelo et al. 2013). Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη χορήγηση αντιοξειδωτικών μορίων, χωρίς να έχει προηγηθεί η εξέταση των ενδογενών επιπέδων αντιοξειδωτικών, μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην ευημερία των ζώων, δρώντας ως προ-οξειδωτικοί παράγοντες (Abuelo et al. 2015).



Εικόνα 23: Συσχέτιση οξειδοαναγωγικής κατάστασης με την ευζωία, παραγωγικότητα και ποιότητα προϊόντων των ζώων (Skaperda, Veskoukis, and Kouretas 2019).

1.8 Προβατοτροφία

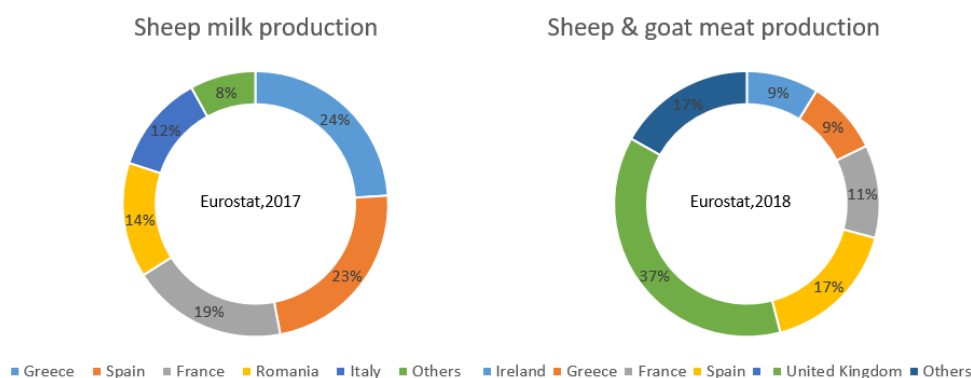
Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries*), μέλος της οικογένειας προβάτων (*Πρόβατον- Ovis*) ανήκει στα θηλαστικά, μηρυκαστικά, μετρίου σώματος και αποτελεί ένα από τα πρώτα ζώα που εξημερώθηκαν λόγω του μεγέθους, της προσαρμογής, της συμπεριφοράς και της κοινωνικής φύσης τους, γεγονός που διευκολύνει τη διαχείριση του από τον άνθρωπο. Έκτοτε, εκτρέφονται συστηματικά, ιδιαίτερα σε απομακρυσμένες και μειονεκτικές περιοχές, παράγοντας πολύτιμα προϊόντα υψηλής βιολογικής αξίας (κρέας, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τυρί, βούτυρο). Ακόμη, προσφέρουν ιδιαίτερα ανθεκτική και ποιοτική πρώτη ύλη (μαλλί), προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υφασμάτων ένδυσης (Balthazar et al. 2017a).

Συστηματική ταξινόμηση	
Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Συνομοταξία	Χορδωτά (Chordata)
Ομοταξία	Θηλαστικά (Mammalia)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (Artiodactyla)
Οικογένεια	Βοοειδή (Bovidae)
Υποοικογένεια	Αιγώδη (Caprinae)
Γένος	Πρόβατον (<i>Ovis</i>)
Είδος	<i>O. aries</i>

Εικόνα 24: Συστηματική κατάταξη προβάτου

Η προβατοτροφία συνήθως αναφέρεται με τον όρο αιγοπροβατοτροφία, εξαιτίας της ανομοιόμορφης εκτροφής μικρών μηρυκαστικών στην χώρα μας. Αποτελεί έναν από τους κυριότερους κλάδους της ελληνικής κτηνοτροφικής παραγωγής, με πρωτεύουσα κατεύθυνση τη γαλακτοπαραγωγή και δευτερεύουσα την κρεοπαραγωγή (“ΖΩΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ” 2011). Όσον αφορά τη σημασία της στην ανάπτυξη της εθνικής οικονομίας, είναι σημαντικό να τονιστεί πως προσφέρει το 13% της συνολικής ακαθάριστης αξίας της αγροτικής παραγωγής (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2012).

Με βάση τα δεδομένα της ΕΛΣΤΑΤ το 2010 (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2010) ο πληθυσμός των προβάτων που εκτρέφονταν στην Ελλάδα ανερχόταν στα 10 εκατομμύρια, γεγονός που έχει ανατραπεί την τελευταία δεκαετία με τον αριθμό αυτών να μειώνεται συνεχώς, καταλήγοντας σε 8.427.196 κατά το έτος 2019 (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2020). Παρά την πτωτική πορεία που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια, η χώρα μας κατέχει την τέταρτη και πρώτη θέση στην παραγωγή πρόβειου κρέατος και γάλακτος αντίστοιχα ανάμεσα στα ευρωπαϊκά κράτη (European Union, 2020) (Economou et al., n.d.).



Εικόνα 25: Κύριοι παραγωγοί αιγοπρόβειου κρέατος, πρόβειου γάλακτος στην Ε.Ε (Eurostat, 2017,2018).

1.8.1 Φυλές προβάτων

Τις φυλές των εκτρεφόμενων προβάτων είναι δυνατό να τις κατατάξουμε στις κάτωθι κατηγορίες με βάση (“Εισαγωγή Στη Ζωοτεχνία,” n.d.):

- τον τύπο του αποδιδόμενου μαλλιού – ερίου: σε τριχοπρόβατα, αναμικτόμαλλα, ομοιόμαλλα, μερινόμαλλα
- τον σκοπό εκτροφής: σε κρεοπαραγωγές, γαλακτοπαραγωγές, εριοπαραγωγές
- το μήκος της ουράς: σε μακρύτερες και βραχύτερες
- τη διάπλαση της ουράς: σε λεπτές, πλατιές-παχιές.

Ο κλάδος της προβατοτροφίας στην Ελλάδα είναι στραμμένος προς την εκτροφή γαλακτοπαραγωγών προβάτων (95% των εκτρεφόμενων προβάτων είναι

γαλακτοπαραγωγά), με ανάλογη κατάσταση να επικρατεί και σε άλλες νότιες χώρες της Ευρώπης. Τα γαλακτοπαραγωγά ζώα παρουσιάζουν λιγότερο ανεπτυγμένη μυϊκή μάζα στον κορμό και στους γλουτούς συγκριτικά με τα κρεοπαραγωγά, ενώ ο θώρακας τους είναι στενός και άσαρκος. Αναφορικά με τη μορφολογία της ουράς, διαθέτουν μακριά, λεπτή ουρά.

Η εκτροφή τους μπορεί να πραγματοποιείται με τα εξής συστήματα: α) εντατικό, που συνεπάγεται διαβίωση σε εκσυγχρονισμένες εγκαταστάσεις και εφαρμόζεται σε πεδινές περιοχές, β) εκτατικό, το κυρίαρχο σε εθνικό επίπεδο, που συνεπάγεται μικρό πληθυσμό ζώων που βόσκει ελευθέρως και υφίσταται μικρής διάρκειας σταβλισμό, καθώς και γ) ημιεντατικό/ημιεκτατικό.

Τέλος, οι φυλές των προβάτων διακρίνονται σε γηγενείς και εισαγόμενες, με τις κυριότερες γαλακτοπαραγωγές να είναι οι Χίου, Άρτας και Καραγκούνικη και East Friesian, Lacaune, Assaf, Sarda αντίστοιχα.

Καραγκούνικη φυλή προβάτων

Η καραγκούνικη φυλή προβάτων αποτελεί μία από τις κυριότερες εγχώριες φυλές και εντοπίζεται κυρίως στο πεδινό τμήμα της Θεσσαλίας, καθώς και σε πεδιάδες της Μακεδονίας και της Βοιωτίας, είτε με τη μορφή ελευθέρως βοσκής ή ημιενσταβλισμένης εκτροφής. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη σωματική διάπλαση, μακριά, λεπτή ουρά και κυρτό επιρρίνιο. Ο χρωματισμός της συγκεκριμένης φυλής ποικίλει, αφού υπάρχουν ζώα με μαύρο ή λευκό χρώμα, αλλά και ορισμένα λευκά που φέρουν μαύρες κηλίδες στο πρόσωπο και στα άκρα.



Εικόνα 26: Πρόβατα της караγκούνικης φυλής.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά εκτροφής, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά ζώα που μπορούν να προσαρμόζονται και να διαβιούν σε ζεστές και κρύες συνθήκες, ανάλογα με τις διακυμάνσεις της κάθε εποχής, ενώ φαίνεται να αντιστέκονται και σε διάφορες ασθένειες (όπως πνευμονία, μαστίτιδα). Εκτρέφονται κυρίως για την απόδοσή τους σε γάλα με μέση απόδοση τα 188 kg/165 ημέρες γαλακτικής περιόδου, ενώ η χρονική διάρκεια της περιόδου κυμαίνεται από 124-206 ημέρες. Το παραγόμενο προϊόν έχει σύσταση: 6.9 % λίπος, 5.35% πρωτεΐνες, ενώ έχουν καλή απόδοση και σε σφάγια (Ihsan, Yudi N. Rizky 2018).

Φυλή Lacaune

Είναι η κυριότερη γαλλική φυλή προβάτων, με κατεύθυνση την γαλακτοπαραγωγή και την αξιοποίηση του προϊόντος στην παραγωγή του διάσημου τυριού ροκφόρ. Περιλαμβάνει ζώα με μέση σωματική ανάπτυξη, ακέρατα με μειωμένη εριοκάλυψη και λευκό χρωματισμό. Η εκτροφή τους γίνεται σε μεγάλες ομάδες ζώων (περίπου 300-500) κατά το ημιεντατικό σύστημα.



Εικόνα 27: Πρόβατο της φυλής Lacaune.

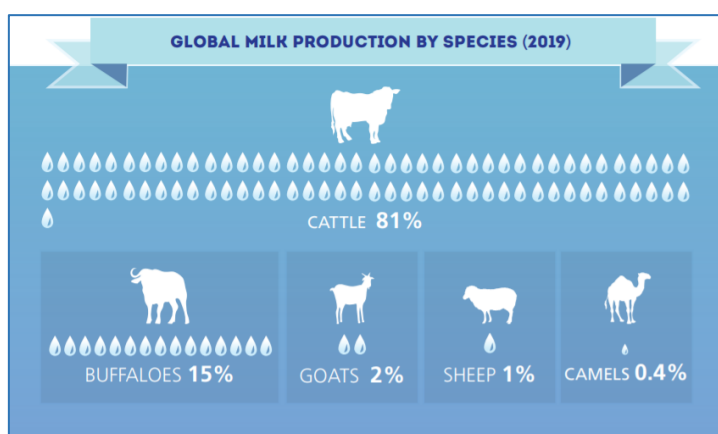
Η προσαρμογή της φυλής στις κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της χώρας μας, την κατέστησε δημοφιλή επιλογή εκτροφής, με αποτέλεσμα να εισάγεται, να εκτρέφεται και να διασταυρώνεται με άλλες αυτόχθονες φυλές. Επίσης, χαρακτηρίζεται για την υψηλή απόδοση σε γάλα, παράγοντας έως και 290 kg/165 ημέρες γαλακτικής περιόδου. Το προϊόν έχει πλούσια περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνες, 6.31% και 5.15% αντίστοιχα (Carta, Casu, and Salaris 2009) (Thomas et al. 2014).

1.9 Πρόβειο γάλα

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αναπόσπαστο μέρος της ανθρώπινης διατροφής, καταλαμβάνοντας το 25-30% ενός μέσου διαιτολογίου (Khan et al. 2019b). Από βιολογικής σκοπιάς, ορίζεται ως το έκκριμα μαστικών αδένων των θηλαστικών, ενώ από χημικής, αποτελεί ένα σύνθετο γαλάκτωμα ελαίου-ύδατος που περιέχει λίπος, λακτόζη, μέταλλα, ένζυμα, ορμόνες, βιταμίνες και πρωτεΐνες: καζεΐνες (αs1, αs2, β και κ-καζεΐνες), πρωτεΐνες ορού γάλακτος (α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη) και δευτερεύουσες (αλβουμίνη ορού, ανοσοσφαιρίνες, λακτοφερρίνη, τρανσφερρίνη, πρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο ή το φολικό οξύ). Βέβαια, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η σύνθεση του ποικίλλουν μεταξύ των ειδών, των φυλών, των ατόμων, της κατάστασης υγείας του μαστού, καθώς και ανάλογα με

εξωγενείς παράγοντες όπως η διατροφή, η διαχείριση, οι περιβαλλοντικές συνθήκες κ.α. (Balthazar et al. 2017a).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, το πιο συχνά καταναλισκόμενο γάλα θεωρείται το βόειο, χάρη στην ευρεία διαθεσιμότητα του και το μαζικό τρόπο παραγωγής, αντιπροσωπεύοντας έτσι το 81% της βιομηχανίας γάλακτος. Τα αμέσως επόμενα γαλακτοπαραγωγά ζώα είναι το βουβάλι (15%), η αίγα (2%), το πρόβατο (1%) και η καμήλα (0,4%), τα οποία κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε αναπτυσσόμενες περιοχές μη ευνοϊκές για την εκτροφή βοοειδών (Sela et al. 2020)



Εικόνα 28: Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος ανά είδος ζώου

Παρά την απόδοση σε μικρές ποσότητες συγκριτικά με εκείνες του γάλακτος των βοοειδών, η παραγωγή πρόβειου γάλακτος είναι ιδιαίτερα σημαντική στις Μεσογειακές περιοχές και στη Μέση Ανατολή, όπου συναντάται μεγάλος πληθυσμός εκτρεφόμενων προβάτων. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια προσελκύει το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων καταναλωτών, καθώς θεωρείται σημαντική πηγή βιοδραστικών ουσιών, ασκώντας ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Balthazar et al. 2017b) . Όσον αφορά την ποιοτική του σύσταση, χαρακτηρίζεται από υψηλή ενεργειακή αξία 5932 kJ/kg, αυξημένη συγκέντρωση σε στερεά συστατικά, πρωτεΐνες, λιπίδια σε σχέση με το βόειο και το αίγιο, ενώ είναι πλούσιο και σε μέταλλα (ασβέστιο, μαγνήσιο, φωσφόρος) (Mohapatra, Shinde, and Singh 2019).

Σύσταση γάλακτος			
	Βόειο	Αίγιο	Πρόβειο
Ολικά στερεά (%)	13.80	12.50	18.50
Στερεά μη λιπαρά (%)	9.00	8.90	12.00
Λίπος (%)	4.09	4.07	6.99
Πρωτεΐνη(%)	3.20–4.00	2.80–3.70	4.50–6.60
Λακτόζη (%)	4.60–4.90	3.90–4.80	3.90–4.90
Νερό (%)	87.80	83.20	82.00

Εικόνα 29: Σύσταση γάλακτος σε διαφορετικά γαλακτοπαραγωγά ζώα.

Ειδικότερα, το πρόβειο γάλα περιέχει 45–72 g πρωτεΐνης /L, εκ των οποίων το 80% είναι σύμπλοκα καζεΐνης και 20% πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Σχετικά με τις καζεΐνες αξίζει να αναφερθεί πως το κύριο κλάσμα αφορά τη β-καζεΐνη (66%) και μετά ακολουθούν αs2 (22,8%), κ (8,9%), αs1- καζεΐνη (6,7%), ενώ στο βόειο γάλα τα αντίστοιχα ποσοστά είναι: 37%, 13%, 40%, 10%. Η αs1 καζεΐνη έχει αποδειχθεί πως ευθύνεται για αλλεργικές αντιδράσεις, συνεπώς η σημαντική μείωση του ποσοστού αυτού στο πρόβειο γάλα υποδηλώνει ότι επάγει χαμηλότερη αλλεργική ευαισθητοποίηση και το καθιστά ιδανική εναλλακτική επιλογή για τους πάσχοντες από αλλεργία (Balthazar et al. 2017). Ακόμη, ανάλυση της σύνθεσης αμινοξικών καταλοίπων στις πρωτεΐνες έχει αποδείξει υψηλή περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα: σερίνη, αλανίνη, ιστιδίνη, βαλίνη και λυσίνη, καθώς και σε προλίνη, η οποία επηρεάζει την παραγωγή αιμοσφαιρίνης (Molik et al. 2012).

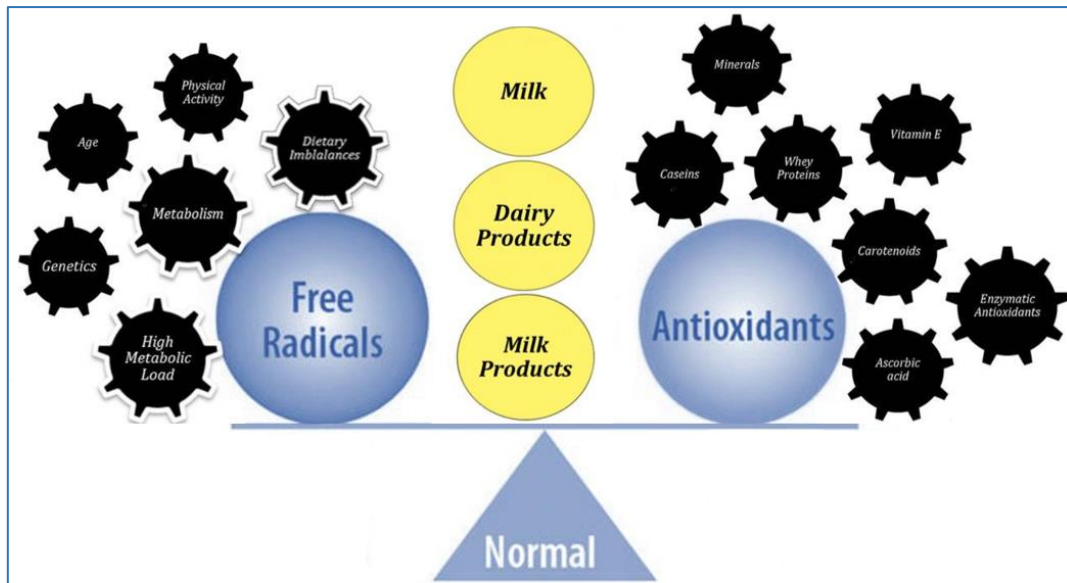
Όσον αφορά τα λιπίδια, στο πρόβειο γάλα εμπεριέχονται σε υψηλό ποσοστό σφαιρίδια λίπους μικρότερης διαμέτρου σε σχέση με το αγελαδινό, καθώς λόγω απουσίας συγκολλητίνης δεν συσσωματοποιούνται, συμβάλλοντας έτσι στην πεπτικότητα και σε έναν πιο αποτελεσματικό μεταβολισμό των λιπιδίων σε σύγκριση με το δεύτερο (Park 1994). Τα σφαιρίδια αυτά αποτελούνται από τριγλυκερίδια στο κύριο μέρος τους, περίπου 98%. Σχετικά με το προφίλ των λιπαρών οξέων, παρουσιάζει υψηλά επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων όπως το καπροϊκό (C6:0), καπρυλικό (C 8:0) και καπρικό (C 10:0) και μέση περιεκτικότητα σε ολικά μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Εμφανίζει επίσης τα υψηλότερα

επίπεδα συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (0,65 g CLA/100 g λιπαρών οξέων), αλλά και μεγάλη ποσότητα βακενικού οξέος (VA), πρόδρομο μόριο του πρώτου (Moatsou and Sakkas 2019).

Τέλος, συνιστά σημαντική πηγή μεταλλικών στοιχείων ιδιαίτερα ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, μαγγανίου, ψευδαργύρου και μικρών ποσοτήτων σιδήρου. Μάλιστα, το γεγονός πως το ασβέστιο συνδέεται στα σύμπλοκα καζεΐνης (τόσο σε οργανική όσο και σε μεταλλική μορφή) οδηγεί στην υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητά του κατά τη διαδικασία πέψης του γάλακτος, θεμελιώδες γεγονός για την ανάπτυξη και συντήρηση οστών (Al-Wabel 2008). Ακόμη, διακρίνεται από αυξημένη περιεκτικότητα υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών σε σύγκριση με τα γάλατα άλλων παραγωγικών ζώων (βοοειδών και αιγών). Αυτό αφορά σχεδόν όλες τις βιταμίνες: βιταμίνη A, B12, E, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νιασίνη, βιοτίνη, ενώ η περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C είναι τόσο καλή, που κατηγοριοποιείται ως πηγή αυτής (Balthazar et al. 2017).

1.9.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα πρόβειου γάλακτος

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών μέσω διατροφικής πρόσληψης λιπόφιλων μορίων: συζευγμένου λινολεϊκού οξέος, βιταμινών E, A, καθώς και υδατοδιαλυτών: βιταμίνης C, καζεϊνών, πρωτεϊνών ορού γάλακτος και ενζυμικών συστημάτων. Κάθε ένα από τα προαναφερθέντα αντιοξειδωτικά συστατικά συμβάλλει στη δημιουργία ενός μοριακού δικτύου ικανού να προστατεύει το γάλα από την οξείδωση των λιπιδίων του, και συνεπώς από την αλλοίωση της ποιότητας (Grażyna et al. 2017b).



Εικόνα 30: Αντιοξειδωτικά συστατικά γάλακτος (Khan et al. 2019a).

Το πιο δραστικό αντιοξειδωτικό μόριο στο λίπος του γάλακτος είναι το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA), το οποίο στο πρόβειο γάλα υπάρχει σε διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με το βόειο. Πρόκειται για ένα μόριο που χαρακτηρίζεται από συζευγμένους διπλούς δεσμούς και συναντάται με τη μορφή 28 cis και trans ισομερών, εκ των οποίων τα CLA cis- 9, trans- 11 και trans- 10, cis- 12 ισομερή εμφανίζουν σημαντική βιολογική δραστικότητα μέσω της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών, χωρίς όμως να είναι σαφής ο μηχανισμός τους (Mohammed Ali et al. 2011). Έχει διαπιστωθεί πως η παρουσία του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος ενίσχυσε τη δραστηριότητα της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου και της καταλάσης, βελτιώνοντας έτσι συνολικά το αντιοξειδωτικό ενζυμικό σύστημα (Chinnadurai et al. 2013), ενώ μεταγενέστερη in vitro μελέτη απέδειξε προστασία των επιθηλιακών κυττάρων από οξειδωτική βλάβη μέσω της de novo σύνθεσης γλουταθειόνης με ενισχυμένη δραστηριότητα λιγάσης γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (Basiricò et al. 2015).

Σημαντικός αντιοξειδωτικός παράγοντας κρίνεται και η βιταμίνη E, η οποία χάρη στη χημική δομή της, υδρόφοβη αλυσίδα και αρωματικός-πολικός δακτύλιος, εντοπίζεται στη φωσφολιπιδιακή διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ακεραιότητάς τους. Η κυριότερη μορφή με την οποία συναντάται η α-τοκοφερόλη αντιδρά άμεσα με δραστικές μορφές και διαταράσσει τις αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης με την μετατροπή της σε σταθερές ρίζες

τοκοφερυλίου. Ακόμη, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση ενζύμων που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τη GSH (υπεροξειδάση, τρανσφεράση, αναγωγή γλουταθειόνης), ενώ δρα συνεργιστικά και με το σελήνιο, καθώς και με τη βιταμίνη Α, προκειμένου να εξουδετερωθούν οι ROS (DellaPenna 2005) (Niki 2014).

Επιπρόσθετα, αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει και η βιταμίνη Α, η συγκέντρωση της οποίας καθορίζεται από τη σύσταση του σιτηρεσίου των προβάτων σε καροτενοειδή (πρόδρομα μόρια). Το β-καροτένιο και η βιταμίνη Α, χάρη στην ύπαρξη συζευγμένων διπλών δεσμών, αδρανοποιούν το μονήρες οξυγόνο, προλαμβάνοντας την οξείδωση του κλάσματος της LDL και αναστέλλοντας την οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων (Grażyna et al. 2017a). Επίσης, το β-καροτένιο αναστέλλει την αυτοοξείδωση των γαλακτοκομικών προϊόντων που επάγεται από το φως, προστατεύοντας την ποιότητα αυτών με τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσής του (Mortensen, Sørensen, and Stapelfeldt 2002).

Όσον αφορά την βιταμίνη C έχει αναφερθεί εκτενώς η αντιοξειδωτική της ικανότητα σε προηγούμενο κεφάλαιο. Πρόκειται για το κύριο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που υπάρχει στο γάλα και δύναται να εξουδετερώσει ριζικά και μη συστήματα: δρα κατά ριζών ανιόντων υπεροξειδίου, αλκοξυλίου, μονήρους οξυγόνου, οξειδίου του σιδήρου και μονοξειδίου του αζώτου (Choe and Min 2009).

Αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν και οι πρωτεΐνες του γάλακτος, καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεόλυση των καζεϊνών, οδηγεί στην απελευθέρωση πεπτιδίων με υδρόφοβα αμινοξέα ή αμινοξικών καταλοίπων (ιστιδίνη, προλίνη, λυσίνη, τυροσίνη) με δυνατότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (Power, Jakeman, and Fitzgerald 2012). Επιπλέον, είναι επιστημονικά τεκμηριωμένη και η αντιοξειδωτική ικανότητα των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος, οι οποίες μπορούν να αναστείλουν αποτελεσματικά την οξείδωση των λιπιδίων, ιδιότητα που οφείλεται στη χηλοποίηση των μετάλλων μετάπτωσης από τη λακτοφερρίνη (Khan et al. 2019b). Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, ως ενισχυτές του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος, έχουν συσχετιστεί είτε με την άμεση δράση τους ως αναγωγικοί παράγοντες ή ως πρόδρομα μόρια του ενδοκυτταρικού σχηματισμού γλουταθειόνης (Priftis et al. 2015).

Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος ενισχύεται και από τη δράση ενζυμικών συστημάτων: σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), καταλάσης (CAT),

υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSHPx) και λακτοπεροξειδάσης (LPx), ενός ειδικού γαλακτικού ενζύμου που καταλύει αντιδράσεις οξείδωσης στις οποίες το H₂O₂ είναι ο δέκτης υδρογόνου (Grażyna et al. 2017a).

2. Σκοπός

Η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, εφαρμόζοντας πειραματικά πρωτόκολλα **μη παρεμβατικής** μεθοδολογίας. Ο σχεδιασμός του πειράματος αφορούσε την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα αίματος δύο διαφορετικών γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του παραγόμενου από αυτά γάλακτος, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του εκτρεφόμενου ζώου και της ποιότητας του προϊόντος του. Έτσι, σε πρώτο επίπεδο, αξιολογήθηκαν βασικοί οξειδοαναγωγικοί δείκτες των έμβιων οργανισμών. Πιο ειδικά, ο έλεγχος αφορούσε αντιοξειδωτικούς παράγοντες: τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity), τη δραστηριότητα του ενζύμου καταλάσης και προϊόντα οξειδωτικής βλάβης, της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τη μέθοδο των TBARS και της οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών (Protein Carbonyls). Για το δεύτερο σκέλος της διπλωματικής, την αποτίμηση της *in vitro* αντιοξειδωτικής δράσης του γάλακτος, προσδιορίστηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης δύο ριζών, της συνθετικής ABTS•+ και της ενδογενούς ρίζας του υδροξυλίου (OH•), καθώς και η αναγωγική τους ικανότητα.

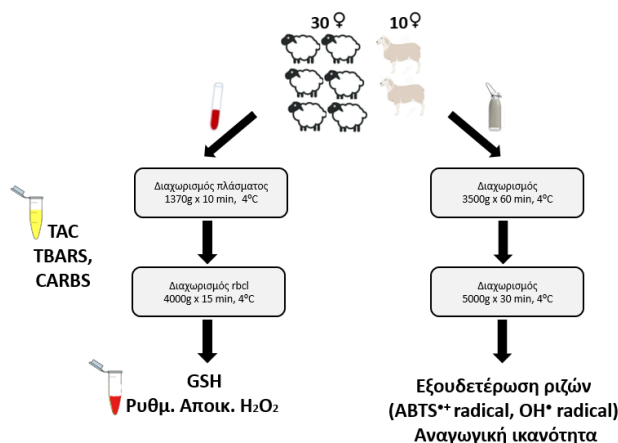
Απώτερος στόχος είναι η συλλογή δεδομένων σχετικά με την οξειδοαναγωγική κατάσταση και την ποιότητα του γάλακτος των δύο συγκρινόμενων γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, ώστε να προκύψουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη ή μη υπεροχής της μίας εκ των δύο φυλών, που εκτρέφονται σε υψηλό ποσοστό στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για τη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας, μελετήθηκαν 40 θηλυκά πρόβατα (*Ovis aries*), δύο διαφορετικών φυλών που έχουν ως πρωτεύουσα κατεύθυνση τη γαλακτοπαραγωγή. Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε 30 προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής, που αποτελεί τη σημαντικότερη εγχώρια φυλή πεδινού τύπου και αποτελούνταν από 20 ελευθέρως βοσκής και 10 ενσταβλισμένες. Στη δεύτερη, εντάχθηκαν 10 ενσταβλισμένα πρόβατα της φυλής Lacaune, γαλλικής προέλευσης με ιδιαίτερη προτίμηση από τους Έλληνες κτηνοτρόφους. Όσον αφορά την ηλικιακή ομάδα αποτελούνταν από ζώα 1-4 ετών, τα οποία βρίσκονταν στο μέσο στάδιο της γαλακτικής περιόδου (76-120 ημέρες μετά τον τοκετό). Όλα τα παραγωγικά ζώα που εξετάστηκαν, εκτρέφονται στον ελλαδικό χώρο και προέρχονται από δύο κτηνοτροφικές μονάδες στην ευρύτερη περιοχή της Καρδίτσας (η μία απαρτίζεται από ζώα ελευθέρως βοσκόμενα και η δεύτερη αποκλειστικά από ενσταβλισμένα). Η διατροφή των ενσταβλισμένων περιλαμβάνει βασικό σιτηρέσιο (σανός μηδικής, άχυρο σίτου, κ.ά.) και συμπληρωματικά χορηγείται και ζωοτροφή από αραβόσιτο, κατάλληλη για αυξημένη γαλακτοπαραγωγή με την εξής σύσταση: ολικές αζωτούχες ενώσεις 17%, ολικές λιπαρές ουσίες 3.7%, ολικές ινώδεις ουσίες 7%, τέφρα 8%, ασβέστιο 1%, φώσφορος 0.7%, νάτριο 0.4%, μαγνήσιο 0.25% και υγρασία 12%.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος διεξήχθη μια αιμοληψία και μια δειγματοληψία συλλογής γάλακτος, διαδικασίες που εκτελέστηκαν με σεβασμό προς τα ζώα, όπως ορίζει ο κανονισμός της ΕΕ 2010/63/ΕΕ για τα πειράματα σε ζωικούς οργανισμούς για επιστημονικούς σκοπούς.



Εικόνα 31: Αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού.

3.2 Μέθοδοι λήψης δειγμάτων

Συλλογή αίματος

Πραγματοποιήθηκε συλλογή αίματος σε σωληνάρια με 200μL EDTA 7.5% και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο εργαστήριο για την επεξεργασία του.

Επεξεργασία αίματος

Μετά την πραγματοποίηση της αιμοληψίας, ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις του ολικού αίματος, προκειμένου να γίνει διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθροκυττάρων (red blood cell lystate – rbc1). Η πρώτη φυγοκέντρωση έγινε σε συνθήκες 1370 g, 10 min, 4°C, προκειμένου να παραληφθεί ως υπερκείμενο το πλάσμα και να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -80°C, μέχρι τη μέτρηση. Το ίζημα που καθίζανε, συμπληρώθηκε με ίσο όγκο απιονισμένου νερού, ανακινήθηκε και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε 4000 g, 15 min, 4°C. Το τελικό υπερκείμενο, προϊόν της λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, συλλέχθηκε και διατηρήθηκε στις ίδιες συνθήκες με το πλάσμα.

Το πλάσμα αξιοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) και της οξειδωτικής τροποποίησης των λιπιδίων και πρωτεϊνών (TBARS, CARBS), ενώ το ερυθρόλυμα στον προσδιοσμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηρότητας της καταλάσης.

Συλλογή γάλακτος

Το γάλα συλλέχθηκε σε κωνικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης των 50 mL και ψύχθηκε αμέσως στους -20 °C.

Επεξεργασία γάλακτος

Αφού συλλέχθηκε το γάλα, πραγματοποιήθηκε πρώτη φυγοκέντρωση σε 3500 g, 60 min, 4°C και δεύτερη σε 5000 g, 30 min, 4°C. Συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

3.3 Πρωτόκολλα εκτίμησης οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα

προβάτων

3.3.1 Προσδιορισμός επιπέδων αιμοσφαιρίνης

Αρχικά, ήταν απαραίτητο να γίνει ποσοτικός υπολογισμός των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, προκειμένου να γίνει κανονικοποίηση μεταξύ των δεικτών. Για να συμβεί αυτό, εφαρμόστηκε η μέθοδος hemiglobincyanide (HiCN) μέσω ενός εμπορικού kit (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία). Η προσθήκη των αντιδραστηρίων έγινε σύμφωνα με τα κάτωθι:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
R1 (Working reagent), pH 7.3	1 mL	1 mL
Απεσταγμένο νερό	5 μL	—
Αιμόλυμα	—	5 μL
Επάση 10 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 540 nm		

Πίνακας 1: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης

Υπολογισμοί

$$Hb (g/dl) = (Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{φυλού}}) \times 29.4$$

3.3.2 Προσδιορισμός επιπέδων συνολικής πρωτεΐνης

Αντίστοιχη διαδικασία έγινε και για την κανονικοποίηση των μετρούμενων στο πλάσμα δεικτών με τον υπολογισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford και δημιουργώντας πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης. Η αντίδραση έλαβε χώρα με βάση τα όσα αναγράφονται στον πίνακα και ακολούθησε επάση ενός τετάρτου και φωτομέτρηση στα 595 nm:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Αντιδραστήριο Bradford	1 mL	1 mL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	—
Πλάσμα	—	20 μL

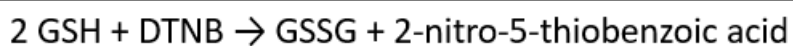
Πίνακας 2: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, που χρησιμοποιείται στο αντιδραστήριο, αντιδρά με συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα, σχηματίζοντας ένα έγχρωμο μπλε προϊόν που απορροφά στα 595 nm.

3.3.3 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης βασίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του μορίου με διθειοδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και το σχηματισμό GSSG και ενός έγχρωμου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 412 nm (Reddy., Y.N., 2004).



Πειραματική διαδικασία

- Προηγείται καθαρισμός των δειγμάτων:
500 μl TCA 5% και 500 μl RBCL αναμίχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min, 4 °C) και 300 μl του υπερκείμενου που προέκυψε αναδεύτηκαν με 90 μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου (15.000 g, 5 min, 4 °C).
- Το τελικό υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση όπως αναγράφεται:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	—
Αιμόλυμα	—	20 μL
DTNB 1 mM σε 1% κιτρικό νάτριο σε dH ₂ O	330 μL	330 μL
Επώαση 15 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 412 nm		

Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης

Υπολογισμοί

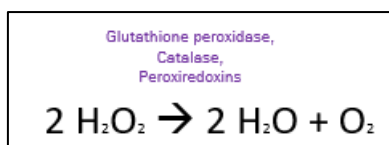
$$\text{Δραστικότητα GSH } (\mu\text{mol/g Hb}) = \frac{(\text{Absδείγματος} - \text{Abστυφλό}/13.6) \times 262.6 \times 1000}{\text{Hb (g/L)}}$$

262.6: συντελεστής αραιώσης (προκύπτει από τελικό όγκο 1010μL/20μL όγκο ιστού =50.5) πολλαπλασιασμένος επί 2 για να ληφθεί υπόψιν η αρχική αραιώση με την προσθήκη dH₂O κατά τη διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων (1:1) και τέλος πολλαπλασιαζόμενος ξανά με το 2 και το 1,3 για να υπολογιστεί η αραιώση που έγινε κατά τον καθαρισμό με τις δύο προσθήκες του TCA , πολλαπλασιάζοντας τελικά με 1000, μετατρέπουμε τα mmol/l σε μmol/l , 13.6: συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

3.3.4 Προσδιορισμός δραστικότητας καταλάσης

Αρχή της μεθόδου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), που παράγεται φυσιολογικά από το μεταβολισμό, εξουδετερώνεται με τη δράση του ενζύμου καταλάσης, παράγοντας H₂O και οξυγόνο:



Πειραματική διαδικασία

- Ανάμιξη των παρακάτω ποσοτήτων:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM , pH 7.4	2991 μl
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό δραστικότητας καταλάσης

- Ανάδευση, επώαση για 10 λεπτά, στους 37 °C.
- Μεταφορά περιεχομένου σε κυψελίδα Quartz, προσθήκη 5 μL 30% H₂O₂, ανάμιξη και μέτρηση δειγμάτων στα 240 nm στα 5 και 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

$$H_2O_2 \text{ decomposition (U/mg Hb)} = \frac{(\Delta Abs_{sample/min} / 40) \times (750 \times 10 \times 2 \times 1000)}{Hb \text{ (mg/mL)}}$$

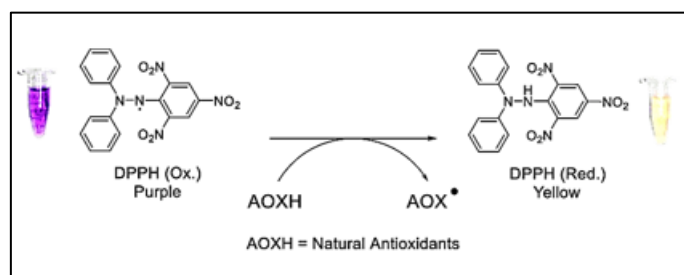
40 mol/L :συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ *1000 για μετατροπή σε μmol/mL, 750: παράγοντας αραιώσης (προκύπτει από 3000 μL τελικού όγκου /4 μL), 10: προκύπτει από την 1:10 v/v αραιώση του RBCL, 2 :προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

3.3.5 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας αποτελεί έναν εύκολο και αξιόπιστο τρόπο αξιολόγησης της ικανότητας των διαφορετικών συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες.

Το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε, στηρίζεται στην αναγωγή της ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) στην αντίστοιχη υδραζίνη με την προσθήκη ατόμων υδρογόνου (Janaszweska και Bartosz, 2002). Η μετατροπή της ρίζας ανιχνεύεται με τον αποχρωματισμό του δείγματος στα 520 nm.



Αρχή μεθόδου TAC (Ioana, Rugina, and Socaciu 2012).

Πειραματική διαδικασία

Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC αναγράφονται στον πίνακα:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL
Πλάσμα	—	20 μL
Επώαση 60 λεπτά σε σκοτάδι, φυγοκέντρωση 15000g, 25 °C, 3 λεπτά, φωτομέτρηση στα 520 nm		

Πίνακας 5: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Υπολογισμοί

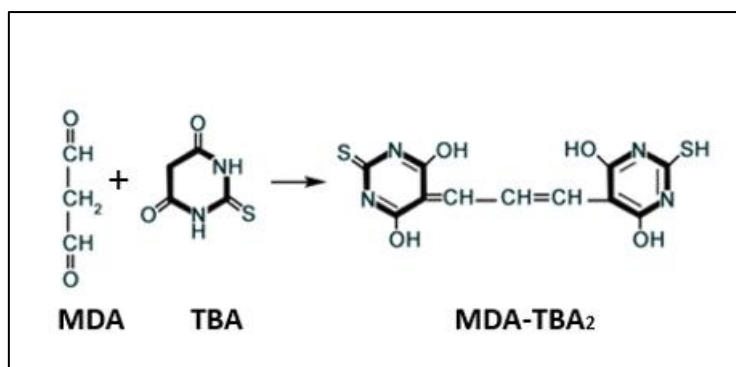
$$\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ μείωση Abs} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$$

100: μετατροπή ποσοστιαίας μείωσης απορρόφησης σε απλή μείωση, 50: η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας, 50: η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα (1000 μl/20 μl), 1000: μετατροπή L σε mL.

3.3.6 Προσδιορισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Αρχή της μεθόδου

Η καθιερωμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης ανιχνεύει το προϊόν της αντίδρασης μαλονδιαλδεϋδης (MDA), που προκύπτει από τη διάσπαση υπεροξειδίων των λιπιδίων, με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και μετράται στα φωτομετρικά στα 530nm (Keles et al.,2001).



Αρχή μεθόδου TBARS (Sochor et al. 2012).

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με τον πίνακα:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Πλάσμα	—	100 μL
Απεσταγμένο νερό	100 μL	—
TCA 35%	500 μL	500 μL
Tris-HCl 200 mM, pH 7.4	500 μL	500 μL
Επώαση 10 λεπτά, θ δωματίου		
Na ₂ SO ₄ (2 M) – TBA (55 mM)	1 mL	1 mL
Επώαση 45 λεπτά, 95°C σε υδατόλουτρο, μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά		
TCA 70 %	1 mL	1 mL
Μεταφορά 1 mL σε eppendorf tubes, φυγοκέντρωση 11200g, 25 °C, 3 λεπτά		
Φωτομέτρηση στα 530 nm		

Πίνακας 6: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Υπολογισμοί

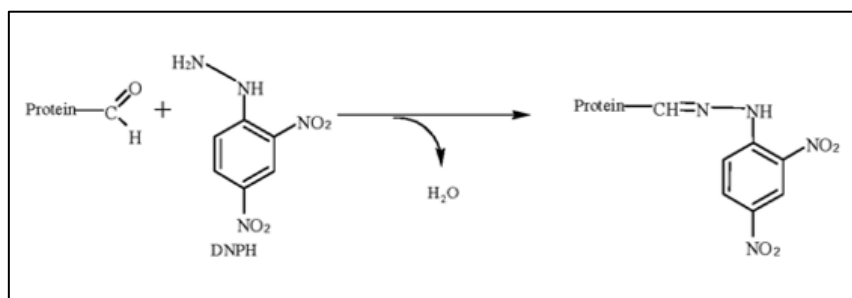
$$\text{Συγκέντρωση TBARS (}\mu\text{mol/L πλάσματος)} = (\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$$

31: συντελεστής αραίωσης (προκύπτει από 3100 μL τελικό όγκο / 100 μL όγκο του πλάσματος= 31), 0.156: συντελεστής μοριακής απόσβεσης* της MDA /10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

3.3.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Αρχή της μεθόδου

Η παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων έχει καθιερωθεί ως αντιπροσωπευτικός δείκτης για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες καθώς και την επίδραση του στα πρωτεϊνικά μόρια. Η ανίχνευσή καθίσταται εφικτή χάρη στην ιδιότητα τους να αλληλεπιδρούν με τη χρωστική 2,4-δινιτρι-φαινυλδραζίνη (DNPH) σχηματίζοντας DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου), που απορροφά στα 375 nm.



Αρχή μεθόδου CARBS (Castegna et al. 2003).

Πειραματική διαδικασία

Στον πίνακα αποτυπώνεται το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε:

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Πλάσμα	50 μL	50 μL
TCA 20%	50 μL	50 μL
Ανάδευση, επώαση 15 λεπτά σε πάγο, φυγοκέντρωση 15000g, 4 °C, 5 λεπτά απόρριψη υπερκειμένου		
DNPH 14 mM (σε 2.5 N HCL)	—	500 μL
2.5 N HCL	500 μL	—
Διάλυση pellet, επώαση 60 λεπτά, θ δωματίου, ανάδευση ανά 15 λεπτά		
Φυγοκέντρωση 15000g, 4 °C, 5 λεπτά , απόρριψη υπερκειμένου		
TCA 10%	1 mL	1 mL
Ανάδευση, φυγοκέντρωση 15000g, 4 °C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου		
Μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v).	1 mL	1 mL
Ανάδευση, φυγοκέντρωση 15000g, 4 °C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου		
5 M ουρία, pH 2.3	1 mL	1 mL
Ανάδευση και επώαση 37 °C, 15 λεπτά		
Φυγοκέντρωση 15000g, 4 °C, 3 λεπτά		
Φωτομέτρηση στα 375 nm		

} x 3

Πίνακας 7: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Υπολογισμοί

$$\text{Συγκέντρωση CARBS (nmol/mg prot.)} = \frac{\{(Abs\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma - Abst\upsilon\phi\lambda\acute{o}\upsilon)\} \times 20}{\text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}}$$

22 mM x cm⁻¹: συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH, 1000/50: συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος).

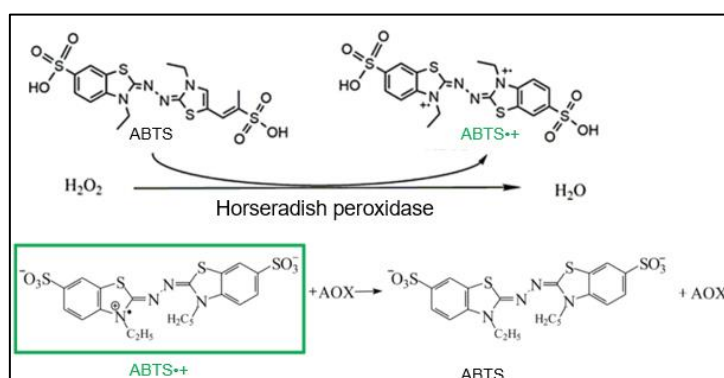
3.4 In vitro cell-free αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πρόβειου γάλακτος

3.4.1 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}

Αρχή της μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται με σκοπό να αποτιμηθεί η ικανότητα μιας συγκεκριμένης ποσότητας δείγματος να εξουδετερώσει τη ρίζα ABTS^{•+}. Πρόκειται για μία τεχνητή ρίζα, που παράγεται εργαστηριακά και χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης υδρόφιλων και λιπόφιλων συστατικών. Προκύπτει από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) με την ενζυμική δράση της περοξειδάσης (HRP), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Η προσθήκη αντιοξειδωτικής ουσίας στο διάλυμα, ανάγει την ρίζα που φέρει πράσινο χρώμα, με αποτέλεσμα να συμβαίνει αποχρωματισμός του δείγματος, ο οποίος μετράται φασματοφωτομετρικά στο μήκος κύματος που απορροφά το ABTS, δηλαδή τα 730 nm.

Η αξιολόγηση της δραστηριότητας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την τιμή IC₅₀, δηλαδή, τη συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος που προκαλεί αναστολή της ρίζα στο 50%. Όσο ελαττώνεται η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση, καθώς απαιτείται μικρή συγκέντρωση ουσίας για να εξουδετερωθεί η ρίζα.



Αρχή μεθόδου εξουδετέρωσης ABTS^{•+} (Becker et al. 2019)(Limbacher et al. 2018).

Πειραματική διαδικασία

Για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλων συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου δείγματος διεξήχθη ανάμιξη διαλυμάτων, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα:

	Δείγμα ελέγχου	Control	Δείγμα	Τυφλό δείγματος
Απεσταγμένο νερό	450 μL	400 μL	400 μL	450 μL
ABTS 1 mM	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂ 30 μM	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
HRP 6 μM	—	50 μL	50 μL	—
Επώαση 45 λεπτά, θ δωματίου, σκοτάδι				
Εξεταζόμενη ουσία	—	—	50 μL	50 μL
Ανάδευση, φωτομέτρηση στα 730 nm				

Πίνακας 8: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•+

Είναι απαραίτητο να μετρηθεί και η απορρόφηση της ίδιας της εξεταζόμενης ουσίας, σε κάθε διαφορετική συγκέντρωση που εξετάζεται, χωρίς την προσθήκη της περοξειδάσης, καθώς ενδέχεται η ίδια να απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

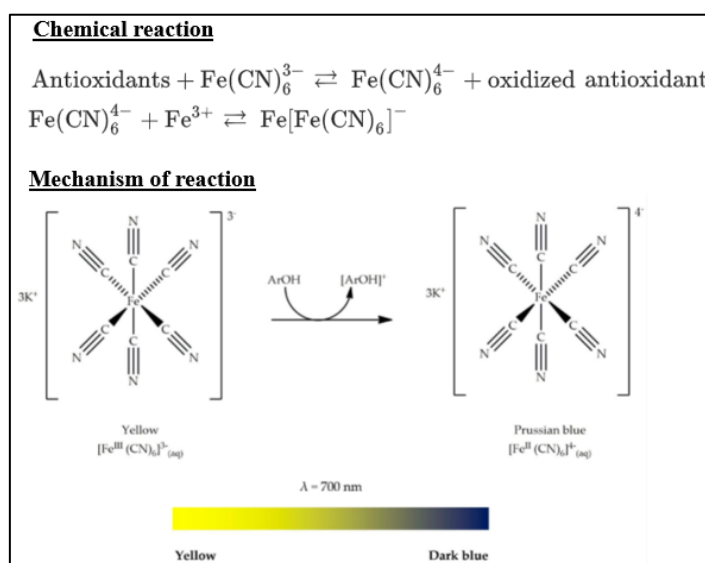
$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

3.4.2 Προσδιορισμός συνολικής αναγωγικής ικανότητας

Αρχή της μεθόδου

Στη μέθοδο αυτή, διερευνάται η ικανότητα του εξεταζόμενου δείγματος να δημιουργεί αναγωγικές συνθήκες περιβάλλοντος, να δρα δηλαδή ως δότης ηλεκτρονίων, προκειμένου να μετατραπούν οι δυνητικά επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες

σε μη δραστικές. Το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται αφορά την αντίδραση του συμπλόκου σιδηροκυανιούχου καλίου ($K_3Fe(CN)_6$) με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα, με αποτέλεσμα να ανάγεται ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) σε δισθενή μορφή (Fe^{2+}) στο προϊόν $K_3[Fe(CN)_6]$. Το τελευταίο αλληλεπιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο, σχηματίζοντας σύμπλοκο $Fe_4[Fe(CN)_6]^3$ και το χρώμα του δείγματος αλλάζει από κίτρινο σε κυανό (Pearl's Prussian blue). Το σύμπλοκο αυτό έχει μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm, όπου και μετράται η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων, και με βάση την τιμή αυτή προσδιορίζεται η συγκέντρωση του Fe^{3+} σε κάθε δείγμα.



Αρχή μεθόδου αναγωγικής ισχύος (Sadeer et al. 2020).

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την τιμή AU0.5, δηλαδή, τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αντιστοιχεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης 0.5. Όσο μειώνεται η τιμή αυτή, τόσο ισχυρότερη η αναγωγική ικανότητα.

Πειραματική διαδικασία

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε:

	Δείγμα ελέγχου	Control	Δείγμα	Τυφλό δείγματος
Εξεταζόμενη ουσία	—	—	50 μL	50 μL
Phosphate buffer 0.2M, pH 6.6	500 μL	250 μL	200 μL	450 μL
Potassium ferricyanide (1% w/v)	—	250 μL	250 μL	—
Επώαση 20 λεπτά, 50 °C, μεταφορά 700 μL υπερκειμένου σε νέα tubes και προσθήκη				
TCA 10%	250 μL	250 μL	250 μL	250 μL
Φυγοκέντρηση 3000 rpm , 10 λεπτά				
Απεσταγμένο νερό	250 μL	250 μL	250 μL	250 μL
Ferric chloride (0.1% w/v)	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Ανάδευση, επώαση 10 λεπτά στο σκοτάδι , φωτομέτρηση στα 700 nm				

Πίνακας 9: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας

Και σε αυτή την περίπτωση μετράται η απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του potassium ferricyanide για να εξεταστεί τυχόν απορρόφησή της στα 700 nm.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$AU = \text{απορρόφηση ουσίας} - \text{απορρόφηση control}$$

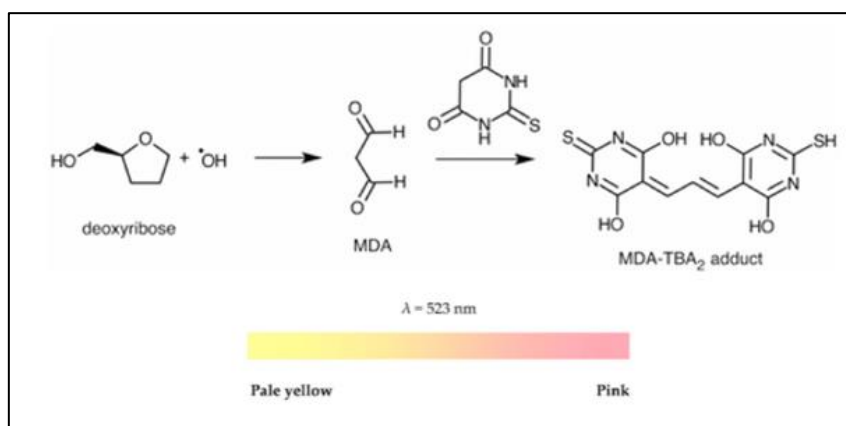
3.4.3 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•]

Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα του υδροξυλίου παράγεται ενδογενώς σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και αποτελεί την δραστικότερη μορφή ελεύθερης ρίζας στον οργανισμό. Επάγει πολλούς τύπους βλάβης στο DNA και το RNA, οδηγώντας σε μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα ενός δείγματος να εξουδετερώνει τη συγκεκριμένη ρίζα αντικατοπτρίζει άμεσα την αντιοξειδωτική τους δράση. Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση της 2-δεοξυριβόζης. Κατά την αντίδραση Fenton, παράγονται ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνουν τη 2-δεοξυριβόζη σε

μαλονδιαλδεΐδη. Η τελευταία αλληλεπιδρά με TBA σχηματίζοντας ένα έγχρωμο ροζ προϊόν που μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 520 nm.

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας επιτυγχάνεται με την τιμή IC50, δηλαδή, τη συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος που αναστέλλει τη ρίζα στο 50%.



Αρχή μεθόδου εξουδετέρωσης OH• (Tremel and Šmejkal 2016).

Πειραματική διαδικασία

Ο πίνακας περιγράφει την ακολουθία βημάτων που διεξήχθησαν:

	Δείγμα ελέγχου	Control	Δείγμα	Τυφλό δείγματος
Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4	225 μL	225 μL	225 μL	225 μL
2-deoxyribose 10 mM	75 μL	75 μL	75 μL	75 μL
FeSO ₄ -EDTA 10 mM	75 μL	75 μL	75 μL	75 μL
H ₂ O ₂ 10 mM	_____	75 μL	75 μL	_____
Απεσταγμένο νερό	375 μL	300 μL	225 μL	300 μL
Εξεταζόμενη ουσία	_____	_____	75 μL	75 μL
Επώαση 60 λεπτά, 37 °C (κλίβανο)				
TCA 2.8 %	375 μL	375 μL	375 μL	375 μL
TBA 1 %	375 μL	375 μL	375 μL	375 μL
Επώαση 10 λεπτά, 95 °C (βρασμός)				
Επώαση 5 λεπτά σε πάγο, φυγοκέντρωση 3000 rpm , 5 λεπτά				
Φωτομέτρηση στα 520 nm				

Πίνακας 10: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας OH•

Και σε αυτή την περίπτωση μετράται η απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης για να εξεταστεί τυχόν απορρόφησή της στα 520 nm.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

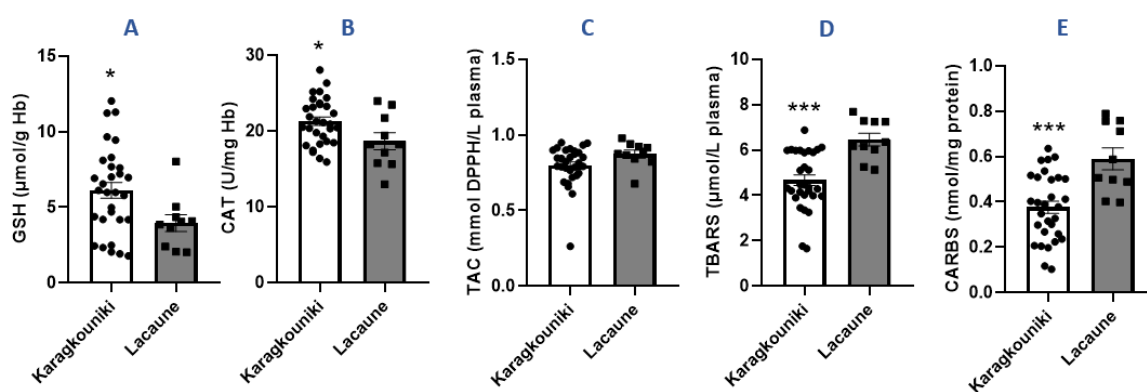
3.5 Στατιστική ανάλυση

Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε ως μέση τιμή \pm SEM, ενώ η στατιστική ανάλυση εκτελέστηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) και τα outliers αφαιρέθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad Outliers. Ειδικότερα, όσον αφορά τη σύγκριση των δύο φυλών για τον εκάστοτε δείκτη οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος, πραγματοποιήθηκε παραμετρική ανάλυση t-test. Στη συνέχεια, για τη διερεύνηση των δεικτών στο αίμα που μπορούν να αποτελέσουν δείκτες πρόβλεψης της ποιότητας του γάλακτος έγινε ανάλυση συσχέτισης Pearson κάθε βιοδείκτη οξειδωτικού στρες με κάθε δείκτη αντιοξειδωτικής δράσης, προκειμένου να αποδειχθεί το μέτρο γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των δύο μεταβλητών. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0.05$, ενώ για την εύρεση συσχετίσεων αξιοποιήθηκαν τα εξής δεδομένα: $|r| > 0.5$ αποδεικνύει την ύπαρξη μέσης συσχέτισης και $|r| > 0.7$ την ύπαρξη ισχυρής σχέσης.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα συγκριτικών μετρήσεων Καραγκούνικης vs Lacaune φυλής προβάτων

4.1.1 Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα Καραγκούνικων και Lacaune προβάτων



Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός των δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα δύο γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, Καραγκούνικης και Lacaune. A) επίπεδα ανοιγμένης γλουταθειόνης, B) δραστηριότητα καταλάσης, C) επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), D) επίπεδα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και E) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).

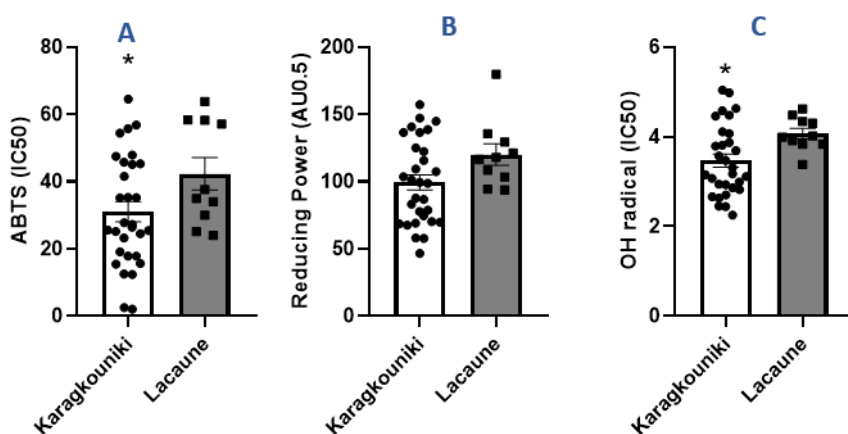
(* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον εκάστοτε βιοδείκτη μεταξύ των ζώων της Καραγκούνικης φυλής και της Lacaune, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Τα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζουν τα αποτελέσματα των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα δύο διαφορετικών φυλών προβάτων, της Καραγκούνικης και Lacaune. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο διάγραμμα (A) φαίνεται η μέτρηση των επιπέδων ανοιγμένης γλουταθειόνης, όπως μετρήθηκε στα ερυθροκύτταρα. Παρατηρούνται στατιστικώς αυξημένα επίπεδα GSH σε Καραγκούνικα πρόβατα σε σχέση με τα Lacaune. Παρόμοιο αποτέλεσμα σημειώνεται και όσον αφορά τη δραστηριότητα του ενζύμου καταλάσης (διάγραμμα B). Ωστόσο, στα

επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ των φυλών.

Σχετικά με τους δείκτες οξειδωτικής βλάβης των μακρομορίων, τα πρόβατα της Καραγκούνικης φυλής επέδειξαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα αποτελέσματα υπεροξείδωσης λιπιδίων ($p=0.0002$) και οξείδωσης των πρωτεϊνικών μορίων ($p=0.0004$) συγκριτικά με τη δεύτερη γαλακτοπαραγωγό φυλή (διάγραμμα D,E).

4.1.2 Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα Καραγκούνικων και Lacaune προβάτων



Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας σε γάλα δύο γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτων, Καραγκούνικης και Lacaune. A) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}, B) αναγωγική δύναμη, C) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•].

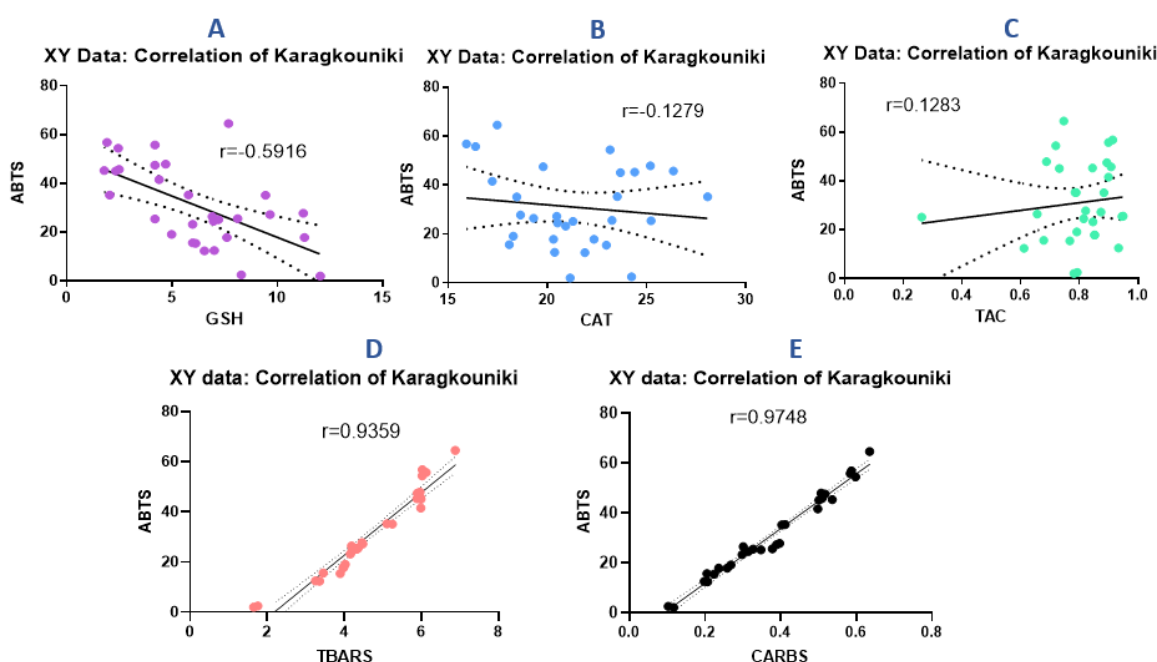
(*Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον εκάστοτε βιοδείκτη μεταξύ των ζώων της Καραγκούνικης φυλής και της Lacaune, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$).

Στο διάγραμμα A εξετάστηκαν οι τιμές IC50 για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS^{•+} του γάλακτος των Καραγκούνικων και Lacaune προβάτων. Είναι γνωστό πως όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του IC50, τόσο μεγαλύτερη αναστολή της ρίζας επιτυγχάνεται και τόσο πιο δραστικό είναι το δείγμα που εξετάζεται. Συνεπώς, στατιστική ανάλυση απέδειξε πως το γάλα της εγχώριας φυλής εμφανίζει σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με εκείνο της γαλλικής φυλής.

Αντίστοιχη κατάσταση παρουσιάζεται και στην εξουδετέρωση της ρίζα $\text{OH}\cdot$ (διάγραμμα C). Το μοτίβο αυτό όμως δεν επιβεβαιώνεται στην ικανότητα των δειγμάτων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, καθώς οι τιμές AUO.5 του γάλακτος της Καραγκούνικης φυλής δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά διαφορές από εκείνο της Lacaune, με αποτέλεσμα η αναγωγική τους ισχύ να θεωρείται παρόμοια.

4.2 Αποτελέσματα συσχετίσεων δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας γάλακτος με δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα διαφορετικών φυλών προβάτων

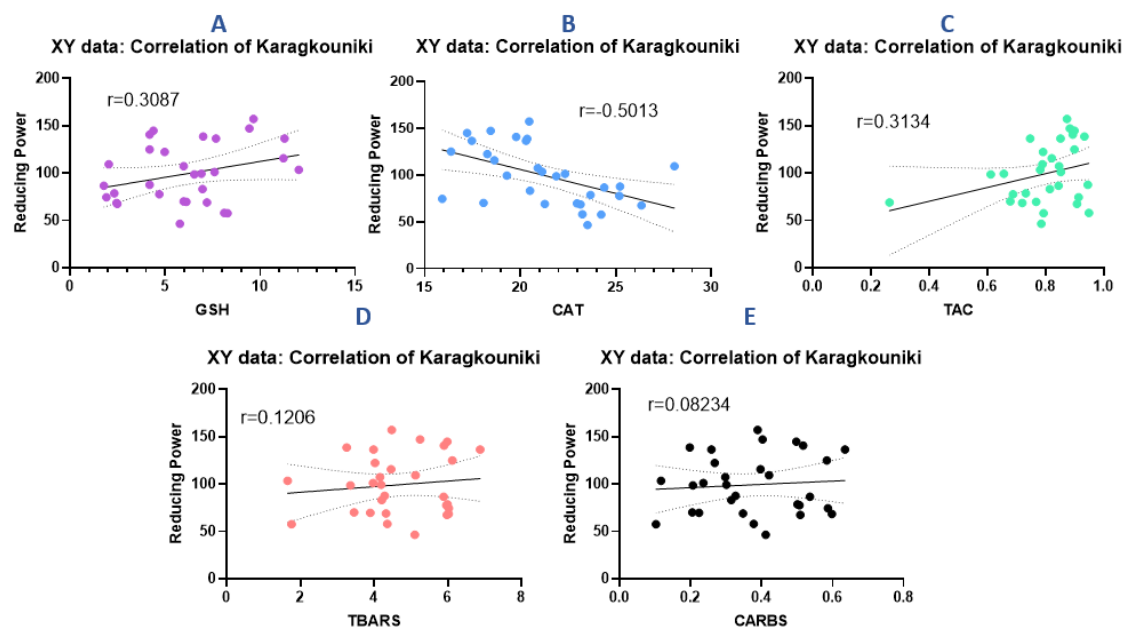
4.2.1 Αποτελέσματα Καραγκούνικης φυλής προβάτων



Διάγραμμα 3: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS^+ radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. Α) GSH, Β) δραστηριότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

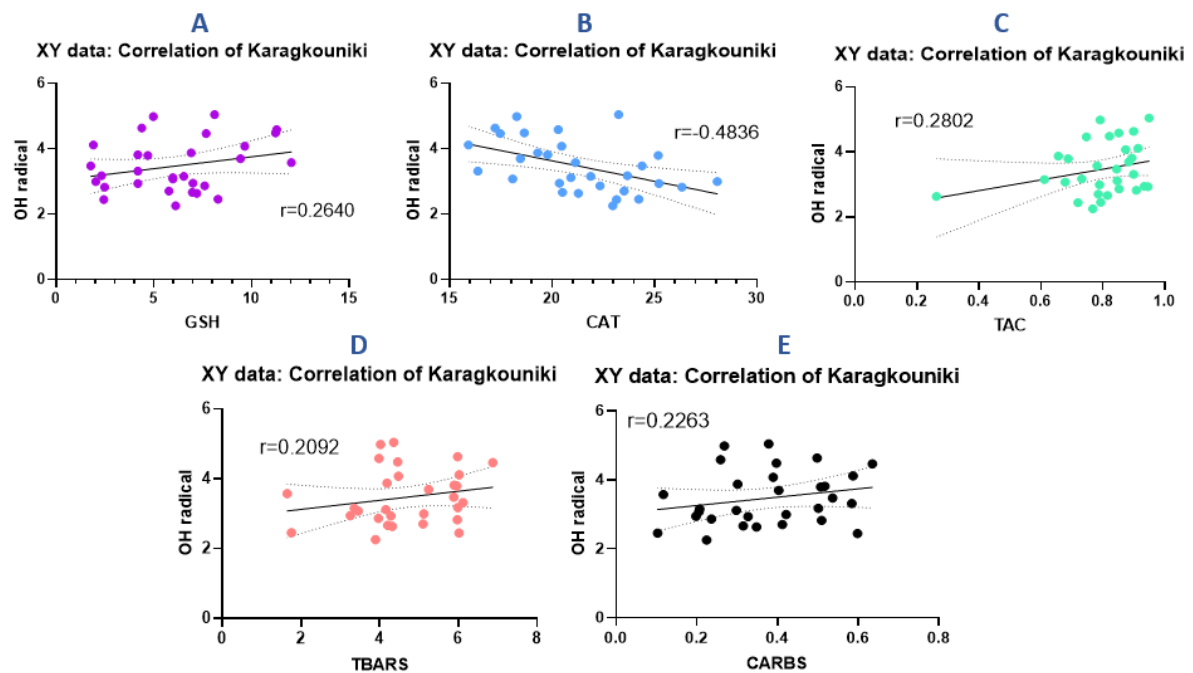
Τα άνωθεν διαγράμματα (A,D,E) αποδεικνύουν πως το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζα ABTS σε γάλα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης ($r=-0.5916$, $p=0.0006$) και ισχυρά θετικά με τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης, λιπιδικής υπεροξειδωσης ($r=0.9359$, $p<0.0001$) και οξείδωσης πρωτεϊνών ($r=0.9748$, $p<0.0001$) στο αίμα.



Διάγραμμα 4: Προσδιορισμός συσχέτισης της αναγωγικής ισχύος σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. Α) GSH, Β) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

Αρνητική συσχέτιση παρατηρείται επίσης, μεταξύ της αναγωγικής ικανότητας του γάλακτος των Καραγκούνικων προβάτων και της δραστικότητας καταλάσης στο αίμα ($r=-0.5013$, $p < 0.005$) (διάγραμμα Β).

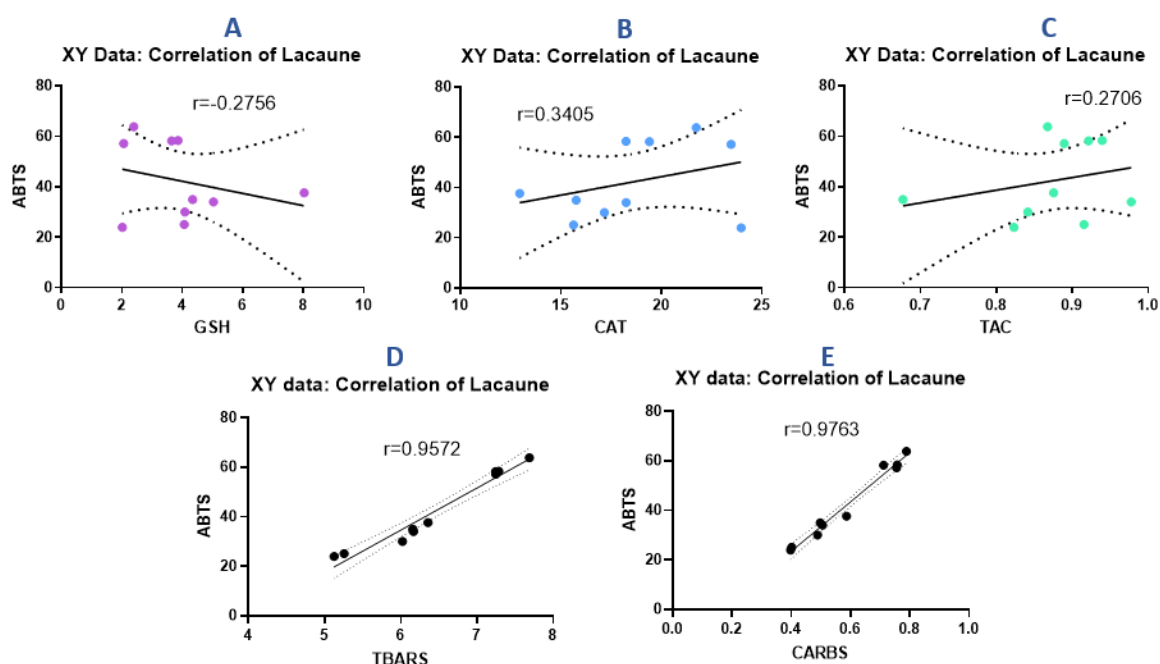


Διάγραμμα 5: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας OH^\bullet radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων. Α) GSH, Β) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

Όσον αφορά τη συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος μέσω της ρίζας OH^\bullet και των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα από Καραγκούνικα πρόβατα δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p > 0,05$).

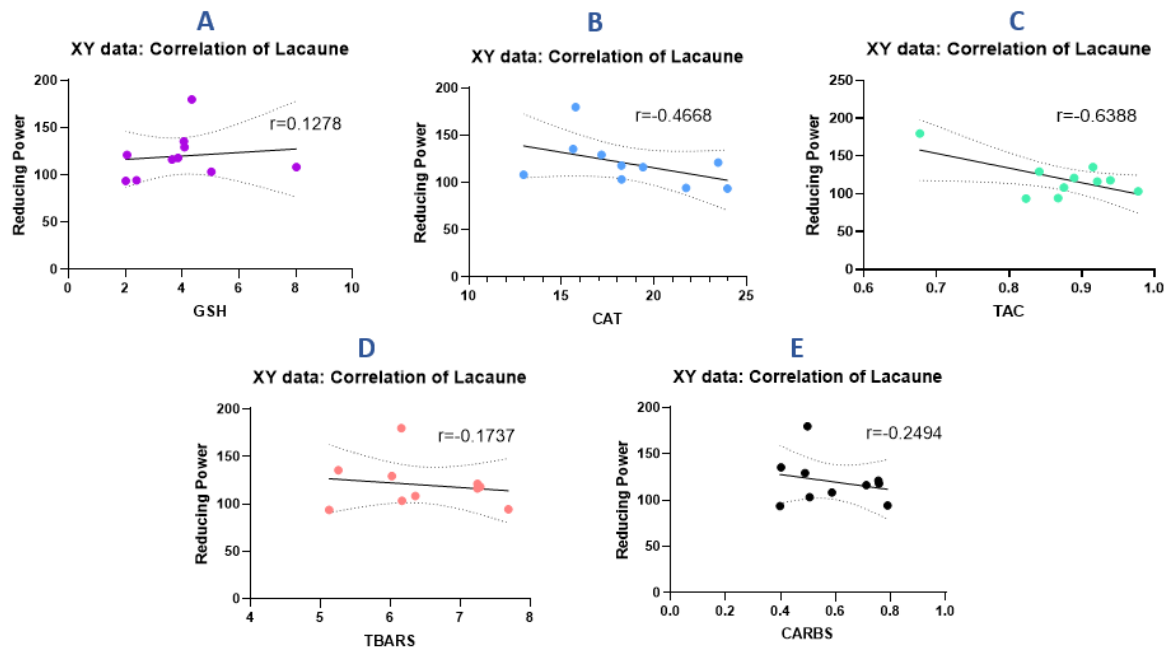
4.2.2 Αποτελέσματα Lacaune φυλής προβάτων



Διάγραμμα 6: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

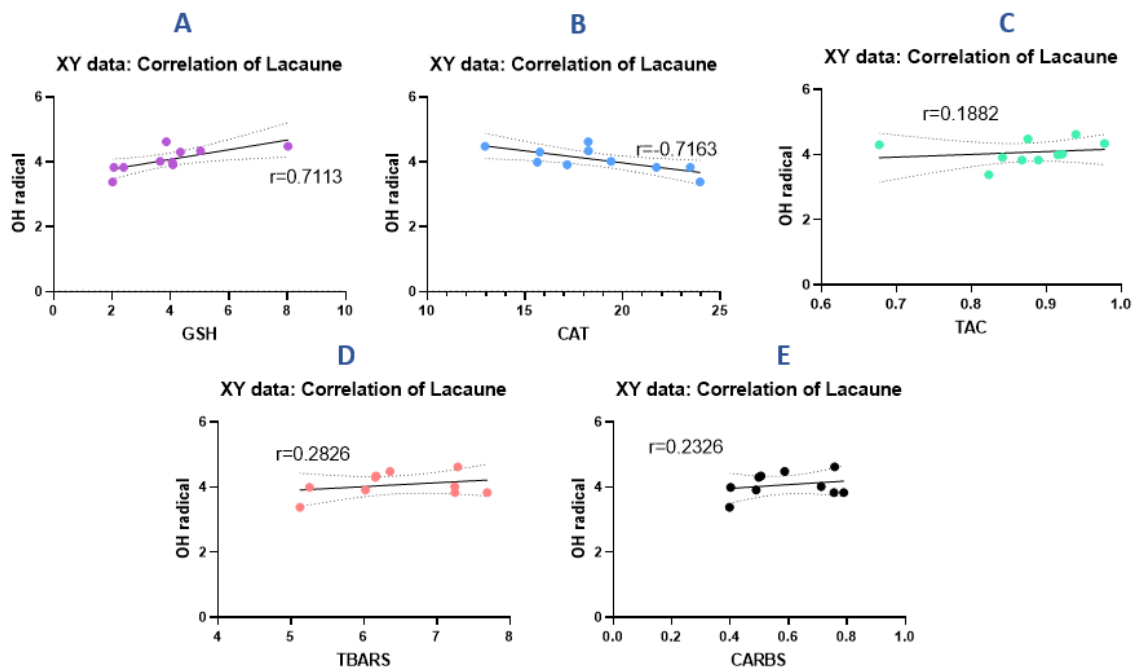
Συσχετίζοντας την ικανότητα αδρανοποίησης της ρίζας ABTS σε γάλα Lacaune προβάτων και του γενικότερου οξειδοαναγωγικού δυναμικού του αίματος αυτών, εμφανίζεται ιδιαίτερα ισχυρή, θετική συσχέτιση τόσο με τον δείκτη υπεροξειδωσης λιπιδίων ($r=0.9572$, $p<0.0001$) όσο και με τον δείκτη των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($r=0.9763$, $p<0.0001$) (διαγράμματα D,E).



Διάγραμμα 7: Προσδιορισμός συσχέτισης της αναγωγικής ισχύος σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. Α) GSH, Β) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

Αρνητική συσχέτιση προσδιορίζεται ακόμη, ανάμεσα στην αναγωγική ισχύ στο γάλα της Lacaune φυλής προβάτων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα αυτών ($r=-0.6388$, $p=0.0468$) (διάγραμμα C).



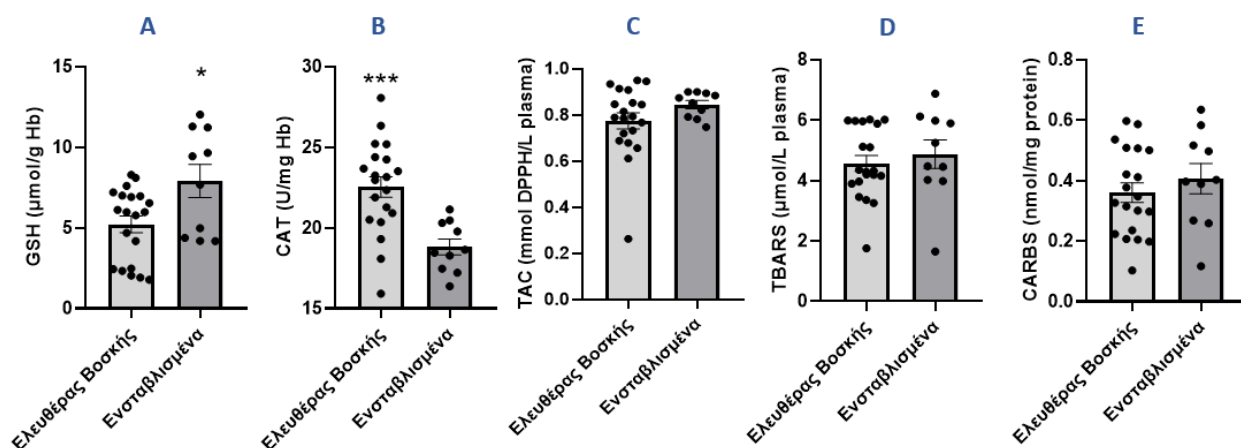
Διάγραμμα 8: Προσδιορισμός συσχέτισης του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας $\text{OH}\cdot$ radical σε γάλα με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα της Lacaune φυλής προβάτων. A) GSH, B) δραστικότητα καταλάσης, C) TAC, D) TBARS, E) CARBS.

(* Η συσχέτιση είναι σημαντική για $p < 0,05$).

Τέλος, συσχέτιση μεταξύ του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας $\text{OH}\cdot$ radical και των δεικτών οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε Lacaune πρόβατα αποδεικνύει ισχυρή θετική σχεδόν γραμμική σχέση με τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης ($r=0.7113$, $p=0.0211$) και αντίστοιχη αρνητική με τη δραστικότητα καταλάσης ($r=-0.7163$, $p=0.0198$) (διαγράμματα A,B).

4.3 Αποτελέσματα συγκριτικών μετρήσεων της Καραγκούνικης φυλής προβάτων (ελευθέρως βοσκής vs ενσταβλισμένων)

4.3.1 Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα Καραγκούνικων προβάτων

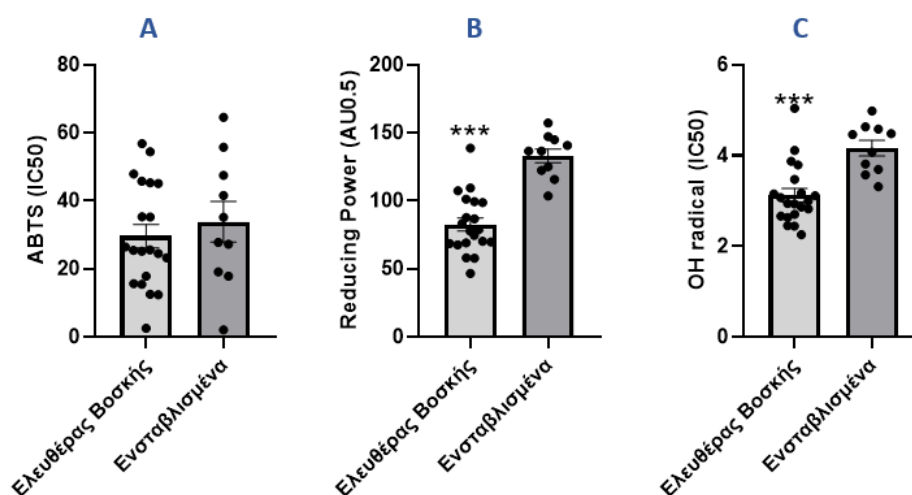


Διάγραμμα 9: Προσδιορισμός των δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα προβάτων Καραγκούνικης φυλής, ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων. Α) επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, Β) δραστηριότητας καταλάσης, Γ) επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), Δ) επίπεδα υπεροξειδωσης των λιπιδίων και Ε) επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).

(*Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον εκάστοτε βιοδείκτη μεταξύ των ζώων ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, * * * $p < 0.001$).

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα διαγράμματα σημειώνεται στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα αυξημένων επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης στην ομάδα των ενσταβλισμένων Καραγκούνικων προβάτων σε σχέση με όσα υφίστανται ελεύθερη βόσκηση (διάγραμμα Α), το οποίο όμως ανατρέπεται στην περίπτωση της δραστηριότητας καταλάσης όπου η δεύτερη ομάδα υπερέχει σε μεγάλο βαθμό της πρώτης ($p=0.0007$) (διάγραμμα Β). Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή.

4.3.2 Αποτελέσματα φασματομετρικών μετρήσεων των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας στο γάλα Καραγκούνικων προβάτων



Διάγραμμα 10: Προσδιορισμός των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας σε γάλα προβάτων Καραγκούνικης φυλής, ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων. Α) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}, Β) αναγωγική δύναμη, C) ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•].

(*Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον εκάστοτε βιοδείκτη μεταξύ των ζώων ελευθέρως βοσκής και ενσταβλισμένων, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω διαγραμμάτων καταδεικνύουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε δύο από τους τρεις μελετηθέντες δείκτες. Πιο συγκεκριμένα, το παραχθέν από ζώα ελευθέρως βοσκής γάλα εμφανίζει υψηλότερη αναγωγική ισχύ ($p < 0,0001$) και ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] ($p = 0,0002$) σε σύγκριση με τα ενσταβλισμένα, και συνεπώς ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (διάγραμμα Β, C). Δεν παρατηρείται βέβαια κάποια σημαντική διαφορά στην ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}.

5. Συζήτηση

Η προβατοτροφία διαδραματίζει σημαντικό οικονομικό, περιβαλλοντικό και κοινωνικό ρόλο σε όλες τις Μεσογειακές χώρες και ιδιαίτερα στην Ελλάδα, στην οποία αποτελεί παραδοσιακά έναν από τους δυναμικότερους παραγωγικούς τομείς. Η δεδομένη κτηνοτροφική δραστηριότητα ασκείται στη χώρα μας από την αρχαιότητα και έχει λάβει μεγάλη ανάπτυξη με την πάροδο των χρόνων, καθώς αξιοποιεί τις εδαφολογικές συνθήκες που επικρατούν (ορεινές, ημιορεινές, άνυδρες περιοχές) και καθιστούν πολλές εκτάσεις ακατάλληλες για γεωργική καλλιέργεια (Pappa et al. 2021). Πέρα από τη συγκεκριμένη γεωμορφολογία, το ήπιο μεσογειακό κλίμα και οι εκτεταμένες παράκτιες ζώνες, συμβάλλουν στη διατήρηση του συστήματος εκτροφής, καθώς εγγυώνται τη διαθεσιμότητα καλοκαιρινών και χειμερινών βοσκοτόπων χωρίς την ανάγκη μετακίνησης σε μεγάλες αποστάσεις (Hadjigeorgiou 2011).

Η παραγωγική κατεύθυνση των εκτρεφόμενων στη χώρα μας προβάτων αφορά κυρίως την γαλακτοπαραγωγή (95% επί του συνολικού ποσοστού των ζώων), και σε δεύτερη κατεύθυνση την κρεοπαραγωγή. Η παραγωγή προϊόντων διατροφής υψηλής θρεπτικής και βιολογικής αξίας (κρέας, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα) σε συνδυασμό με δευτερεύοντα παράγωγα όπως δέρματα, κέρατα, μαλλί και κόπρος, καθιστούν τα πρόβατα καταλυτικό παράγοντα συμβολής στην εθνική οικονομία. Μάλιστα, η Ελλάδα κατέχει εξέχουσα θέση στην απόδοση προϊόντων σε Ευρωπαϊκό επίπεδο και κατατάσσεται πρώτη στην παραγωγή πρόβειου γάλακτος και τέταρτη στην παραγωγή κρέατος μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών με την εκτροφή 8,6 εκατομμυρίων ζώων, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του 2017 (Argyriadou et al. 2020).

Ωστόσο, η απαίτηση εντατικοποίησης των συστημάτων ζωικής εκτροφής προκειμένου να διασφαλιστούν οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες για ζωικά προϊόντα, επηρεάζει την ευζωία των ζώων, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως ασθένειες ή κλιματικές διακυμάνσεις (Tsartsianidou et al. 2021). Η αδυναμία των γηγενών φυλών να βελτιωθούν γενετικά και να ικανοποιήσουν την απαιτούμενη παραγωγή οδήγησε στην εισαγωγή ξένων βελτιωμένων γαλακτοπαραγωγών φυλών και σε σταδιακή αντικατάστασή τους από αυτές (Argyriadou et al. 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Καραγκούνικη φυλή προβάτων, μία από τις κυριότερες ελληνικές φυλές που συμβάλλει στην τυροκομία, της οποίας ο πληθυσμός έχει μειωθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια

εξαιτίας της μέσης απόδοσής της σε γάλα, ανάγκη που καλύπτεται από τη γαλλική φυλή Lacaune, που υπερέχει σε ετήσια απόδοση και εντάσσεται στις σπουδαιότερες γαλακτοπαραγωγές φυλές παγκοσμίως. Η απόδοση της πρώτης αφορά 188 kg προϊόντος/165 ημέρες γαλακτικής περιόδου, ενώ της δεύτερης 290 kg για την ίδια χρονική διάρκεια (Kitsopanidis 2008 ; Thomas et al. 2014).

Πέρα από την αύξηση της παραγωγής γάλακτος, η γαλακτοπαραγωγός προβατοτροφία αντιμετωπίζει και άλλες προκλήσεις, όπως η απαίτηση διάθεσης ασφαλών προϊόντων στους καταναλωτές, καλής μεταχείρισης των ζώων (συνθήκες σταβλισμού, διαχείρισης, διατροφής) και διασφάλισης της μακροπρόθεσμης ανταγωνιστικότητας και βιωσιμότητας του κλάδου (Banos et al. 2019). Από τις σημαντικότερες προκλήσεις της σύγχρονης κτηνοτροφίας θεωρείται και η εξασφάλιση ευζωίας των ζώων, καθώς η κατάσταση υγείας αυτών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με εκείνη των ανθρώπων.

Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής τους ζωής, τα μηρυκαστικά υπόκεινται σε πολλές περιβαλλοντικές ή μεταβολικές μεταβολές που επάγουν οξειδωτικό στρες. Χαρακτηριστικά, αλλαγές στη σύσταση της διατροφής δύνανται να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση των προβάτων, όπως αποδεικνύεται με εμπλουτισμό της ζωοτροφής προβάτων με περισσότερα λιπαρά (αύξηση από 2,6% σε 5,4%) που οδήγησε σε διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sgorlon et al. 2008). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως και ο υποσιτισμός, ακατάλληλες κτηνοτροφικές πρακτικές και απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας αποτελούν ερεθίσματα αύξησης των ενδογενών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου, επάγοντας στρες στη φυσιολογία των ζώων (Puppel, Kapusta, and Kuczyńska 2015). Το προκύπτον οξειδωτικό στρες επιφέρει αρνητικές συνέπειες στην κατάσταση υγείας κτηνοτροφικών ζώων, καθώς έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες όπως σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων και φλεγμονή στην αναπνευστική οδό (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Συνεπάγεται έτσι, πως χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση του οξειδοαναγωγικού προφίλ και κατ' επέκταση της υγείας των παραγωγικών ζώων. Μελέτη της ομάδας του εργαστηρίου μας διερεύνησε τη συμπλήρωση ζωοτροφών με παραπροϊόντα οινοποιείων και ελαιοτριβείων και τεκμηρίωσε την αρχική υπόθεση, παρατηρώντας μείωση σε δείκτες οξειδωτικής βλάβης (σε λιπίδια, πρωτεΐνες), ενισχύοντας την υγεία των ζώων (Makri et al. 2017 ; Makri et al. 2018). Μάλιστα, έχει προταθεί πως η συμπλήρωση της διατροφής με αντιοξειδωτικούς παράγοντες επιδρά ευεργετικά και

στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (κρέας/γάλα), προσδίδοντας προστιθέμενη αξία σε αυτό (Castillo et al. 2013). Χορήγηση οργανικού σεληνίου σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του ιχνοστοιχείου στο γάλα και εν συνεχεία σε αυξημένη πρόσληψη από τον ανθρώπινο οργανισμό (Sretenović et al. 2007). Ακόμη, αποδείχθηκε πως φυσικά παραπροϊόντα στέμφυλων όχι μόνο αποκατέστησαν την οξειδοαναγωγική ισορροπία στο αίμα προβάτων, αλλά συνέβαλλαν και στην προστασία των πρωτεϊνών γάλακτος από το φαινόμενο της οξείδωσης (Buffa et al. 2020).

Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός μελετών παρουσιάζει αντιφατικά αποτελέσματα της διαιτητικής συμπλήρωσης με αντιοξειδωτικά. Ειδικότερα, συμπλήρωση της διατροφής κοτόπουλων κρεοπαραγωγής με συνθετικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες δεν επέφερε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην οξειδωτική κατάσταση των οργανισμών (Vossen et al., n.d.). Επίσης, χορήγηση βιταμίνης E σε βοοειδή κατά την ξηρά περίοδο που μεσολαβεί μεταξύ των γαλακτικών, απέτυχε να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση αυτών, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης μαστίτιδας (Bouwstra et al. 2010). Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της συνεργιστικής δράσης των αντιοξειδωτικών, με αποτέλεσμα η χορήγηση υψηλών δόσεων μεμονωμένων βιταμινών να οδηγήσει σε περίσσεια αυτών και τελικά στη δράση των αντιοξειδωτικών ως προ-οξειδωτικοί παράγοντες, όταν βρίσκονται σε περίσσεια (Rizzo et al. 2013). Γενικότερα, το παράδοξο της χορήγησης αντιοξειδωτικών, αποδίδεται στην καταστολή του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού, στη χρήση αναποτελεσματικών δόσεων ή στην περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα των χρησιμοποιούμενων θεραπειών (Z et al. 2021).

Για αυτόν ακριβώς το λόγο κρίνεται απαραίτητο να γίνει επανασχεδιασμός των παρεμβάσεων για τη βελτίωση της κατάστασης υγείας των εκτρεφόμενων ζώων, αφού προηγηθεί ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού ενάντια στις δραστικές μορφές. Με αυτό το σκεπτικό σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε το ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται πλήθος μελετών για τον εμπλουτισμό ζωοτροφών με φυσικά ή/και συνθετικά αντιοξειδωτικά, μικρό ποσοστό αυτών διερευνά τα βασικά επίπεδα αντιοξειδωτικών βιοδεικτών σε παραγωγικά ζώα. Η αξιοποίηση μη παρεμβατικών πειραματικών πρωτοκόλλων αναβαθμίζουν τη σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων της μελέτης, καθώς θα αποτελέσουν το πρώτο βήμα εδραίωσης κρίσιμων ορίων για την εφαρμογή διατροφικών στρατηγικών χορήγησης εξωγενών αντιοξειδωτικών.

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία βασίζεται στην εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων παρακολούθησης της κατάστασης υγείας γαλακτοπαραγωγών προβάτων δύο συγκεκριμένων φυλών και της ποιότητας του παραγόμενου από αυτά γάλακτος, με απώτερο στόχο τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων, που θα αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για τη διαχείριση των κτηνοτροφικών μονάδων και θα αναδείξει την προστιθέμενη αξία στο πρόβειο εγχώριο γάλα. Προς αυτή την κατεύθυνση, αξίζει να προσδιοριστούν συγκεκριμένοι βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα αίματος της Καραγκούνικης φυλής προβάτων καθώς και της γαλλικής φυλής Lacaune, δεδομένα που θα συσχετιστούν με την αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος αυτών, προκειμένου να προκύψει μια ολοκληρωμένη εικόνα της σύγκρισης των δύο φυλών. Η Καραγκούνικη φυλή προβάτων συγκαταλέγεται στις πιο διαδεδομένες ελληνικές φυλές με συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων εγχώριων, καθώς πρόκειται για ιδιαίτερα ανθεκτικά ζώα με υψηλή προσαρμοστικότητα. Ωστόσο, έχουν μέση γαλακτοπαραγωγική απόδοση ετησίως, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να έχει μειωθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Αντίθετα, υπάρχει μεγάλη προτίμηση των κτηνοτρόφων για τη γαλλική Lacaune, η οποία εισήχθη στη χώρα μας για πρώτη φορά το 1993 και έκτοτε εκτρέφεται εντατικά χάρη στη σημαντικά υψηλή απόδοσή της σε προϊόν. Έτσι, τα δεδομένα αντιπαραβολής των χαρακτηριστικών των δύο φυλών θα συνεισφέρουν στην ανάδειξη των Καραγκούνικων προβάτων και θα οδηγήσουν σε σταδιακή αποκατάσταση του πληθυσμού τους. Κατ' επέκταση θα ενισχυθεί η τοπική κτηνοτροφία, καθώς η συγκεκριμένη φυλή εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Τμήμα της ερευνητικής εργασίας αυτής αποτελεί η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Αντικείμενο αυτής ήταν η εκτίμηση βασικών επιπέδων δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα αίματος και γάλακτος από 40 πρόβατα του είδους *Ovis aries*, εκ των οποίων 30 προέρχονταν από την Καραγκούνικη φυλή (20 ελεύθερας βοσκής και 10 ενσταβλισμένα) και 10 από τη φυλή Lacaune (ενσταβλισμένα). Στο αίμα έγινε προσδιορισμός των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της δραστηριότητας καταλάσης (CAT), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC – Total Antioxidant Capacity), ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances) και τέλος των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS- Protein Carbonyls). Στο γάλα μελετήθηκαν δείκτες αντιοξειδωτικής

ικανότητας: εξουδετέρωση της συνθετικής ρίζας ABTS^{•+}, αναγωγική ικανότητα, εξουδετέρωση της ενδογενούς ρίζας OH[•].

Το σημαντικότερο ενδογενές συστατικό του συστήματος αντιοξειδωτικής άμυνας κρίνεται η γλουταθειόνη, ιδιότητα που βασίζεται στην αναστρέψιμη ικανότητα οξείδωσής της και στις υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της. Έτσι, μείωση των συγκεντρώσεων GSH μπορεί να αντανάκλα εξάντληση του αποθέματος αντιοξειδωτικών λόγω ύπαρξης οξειδωτικής βλάβης. Αξιολογώντας λοιπόν, τα αποτελέσματα της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των δύο συγκρινόμενων φυλών, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα αυτής σε πρόβατα της Καραγκούνικης φυλής σε σύγκριση με τη φυλή Lacaune ($p < 0.05$), ενώ μεταξύ των Καραγκούνικων προβάτων υψηλότερη τιμή προσδιορίστηκε στα ενσταβλισμένα ζώα σε σχέση με εκείνα της ελευθέρως βόσκησης ($p < 0.05$).

Ακολούθως, εκτιμήθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης H₂O₂, διεργασία που πραγματοποιείται από πλήθος ενζύμων: περοξειρεδοξίνες, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καταλάση. Ωστόσο, στα ερυθροκύτταρα, η μετατροπή του H₂O₂ σε μοριακό οξυγόνο και νερό αποδίδεται κυρίως στην καταλάση, της οποίας η συγκέντρωση είναι ιδιαίτερα υψηλή σε αυτόν τον κυτταρικό τύπο, συνεπώς και η ενζυμική της δράση (Masters, Pegg, and Crane 1986). Η αντιοξειδωτική δράση του συγκεκριμένου ενζύμου είναι πολύ σημαντική, καθώς εμποδίζει την παραγωγή της επιβλαβούς ρίζας OH[•]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η δραστηριότητα καταλάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσιάζει γραμμική συσχέτιση με τη διάρκεια ζωής στα θηλαστικά. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη σε Καραγκούνικα πρόβατα συγκριτικά με τα Lacaune ($p < 0.05$). Η σύγκριση που αφορά τις συνθήκες βόσκησης εντός της ίδιας φυλής απέδειξε ισχυρή ενζυμική δραστηριότητα στα ελευθέρως βοσκής Καραγκούνικα έναντι των ενσταβλισμένων ($p=0.0007$), ίσως ως μια προσπάθεια ενίσχυσης του αντιοξειδωτικού τους συστήματος, καθώς τα αποτελέσματα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν συγκριτικά χαμηλότερα.

Ο επόμενος δείκτης που αξιολογήθηκε είναι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο όρος αυτός αναφέρεται στη συνολική ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες και περιλαμβάνει τόσο ενζυμικά συστήματα όσο και χαμηλού μοριακού βάρους μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, που είναι είτε ενδογενή είτε διαιτητικά. Ο συγκεκριμένος βιοδείκτης είναι αντιπροσωπευτικός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του οργανισμού και προσδιορίζεται στο αίμα ζώων

που μπορεί να αποκτηθεί εύκολα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ των φυλών, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των γαλακτοπαραγωγών φυλών, μοτίβο κοινό και στη σύγκριση εντός της Καραγκούνικης φυλής ($p > 0.05$).

Μεταξύ των μηχανισμών οξειδωτικής βλάβης, η διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων έχει διερευνηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Αποτελεί βασική ένδειξη οξειδωτικού στρες και προσδιορίζεται μέσω της ποσοτικοποίησης πρωτογενών (λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων) ή δευτερογενών προϊόντων (προϊόντα διάσπασης υπεροξειδίων) της υπεροξειδωσης. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος αφορά ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (μεταξύ αυτών και η μαλονδιαλδεϋδη), TBARS. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια, παρουσιάστηκε μείωση των επιπέδων TBARS στα Καραγκούνικα πρόβατα συγκρίνοντας με τα Lacaune, η οποία επιδεικνύει ισχυρή στατιστική σπουδαιότητα ($p=0.0002$). Σύγκριση εντός της ίδιας φυλής δεν παρουσίασε κάποια σημαντική μεταβολή ($p > 0.05$).

Ο τελευταίος δείκτης που αξιολογήθηκε αφορούσε την καρβονυλίωση πρωτεϊνών, μια από τις πιο επιβλαβείς μη αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στην Καραγκούνικη φυλή παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων σε σχέση με τη φυλή Lacaune ($p=0.0004$). Όσον αφορά τη σύγκριση των Καραγκούνικων δεν προέκυψε κάποιο σημαντικό εύρημα ($p > 0.05$).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων στο αίμα, αξίζει να σημειωθεί πως τα πρόβατα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων εμφανίζουν περισσότερο βελτιωμένη οξειδοαναγωγική κατάσταση συγκρινόμενα με πρόβατα της γαλλικής Lacaune, καθώς παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και υψηλότερη ενζυμική δράση της καταλάσης. Το βελτιωμένο αυτό αντιοξειδωτικό προφίλ μπορεί να εξηγήσει και τα μειωμένα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών, τα οποία φαίνεται να είναι προστατευμένα από οξειδωτικές βλάβες. Σχετικά με τη σύγκριση των συνθηκών διαχείρισης, δεν προκύπτει κάποιο αποτέλεσμα καθώς τα πρόβατα ελευθέρως βόσκησης εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό αποικοδόμησης H_2O_2 , ενώ τα ενσταβλισμένα αυξημένα βασικά επίπεδα ενδογενούς συγκέντρωσης GSH. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα ρυθμίζουν τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, παρόμοια μελέτη του συστήματος εκτροφής σε γαλακτοπαραγωγά βοοειδή αποκάλυψε

αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα εξαιτίας της υψηλής πρόσληψης λιποδιαλυτών βιταμινών Α και Ε, μέσω της βοσκής χορταριού (Celi 2011). Επόμενη μελέτη σύγκρισης μεταξύ της βόσκησης προβάτων και της πλήρους εκτροφής σε ενσταβλισμένες συνθήκες με συμπλήρωση της διατροφής με αντιοξειδωτικά κατέληξε στο συμπέρασμα πως η πρώτη ομάδα ζώων παρουσίασε υψηλότερη δραστικότητα καταλάσης (CAT) και υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) σε σύγκριση με τη δεύτερη, αντιοξειδωτική άμυνα η οποία οδήγησε και σε αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (αλδεΐδες και κετόνες) (Luo et al. 2019).

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής, πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος των δύο συγκρινόμενων φυλών. Είναι σκόπιμη η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, χρησιμοποιώντας περισσότερες από μία μεθόδους λόγω της πολύπλοκης φύσης των αντιοξειδωτικών συστατικών. Αρχικά, αξιολογήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων γάλακτος να εξουδετερώσουν την τεχνητή ρίζα ABTS⁺, έναν ιδιαίτερα αξιόπιστο δείκτη αντιοξειδωτικής δράσης καθώς χαρακτηρίζεται από καλή επαναληψιμότητα και ανιχνεύει υδρόφιλα και λιπόφιλα μόρια. Το γάλα της Καραγκούνικης φυλής προβάτων εμφάνισε ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της συγκεκριμένης ρίζας σε σχέση με εκείνο της φυλής Lacaune ($p < 0.05$), χωρίς να παρατηρηθεί κάποια διαφορά εντός της φυλής ($p > 0.05$).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η αντίδραση των αντιοξειδωτικών μορίων των δειγμάτων με ανόργανα οξειδωτικά (Fe^{3+}), προκειμένου να αξιολογηθεί η αναγωγική ικανότητα. Η αναγωγική ισχύς μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της δράση, καθώς δείχνει ότι οι ουσίες είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα των διεργασιών υπεροξειδωσης των λιπιδίων, δρώντας ως πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά (Chanda and Dave 2009). Τα αποτελέσματα δεν αποκάλυψαν κάποια αξιόπιστη μεταβολή μεταξύ των προϊόντων των δύο φυλών ($p > 0.05$). Ωστόσο, στατιστική ανάλυση δειγμάτων της Καραγκούνικης φυλής απέδειξε ισχυρότερη συνολική αναγωγική δύναμη στο γάλα προβάτων ελευθέρως βοσκής συγκριτικά με όσα πρόβατα εκτρέφονταν σε σταβλισμένες συνθήκες ($p < 0,0001$).

Προσδιορίστηκε επίσης, η ικανότητα αδρανοποίησης της ενδογενώς παραγόμενης ρίζας OH^{\bullet} , ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο που δύναται να αντιδράσει με νουκλεοτίδια στο DNA, προκαλώντας θραύση κλώνου που οδηγεί σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα. Αποδείχθηκε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενάντια σε αυτή τη ρίζα στο γάλα από Καραγκούνικα πρόβατα σε σύγκριση

με το παραγόμενο από Lacaune ($p < 0.05$), ενώ σπουδαίο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε ό,τι αφορά την πρώτη φυλή, καθώς τα πρόβατα ελευθέρως βοσκής σημείωσαν σημαντικά αυξημένη αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενα με τα ενσταβλισμένα ($p=0,0002$).

Συγκεντρώνοντας τα συμπεράσματα των άνωθεν παρατηρήσεων, είναι αντιληπτό πως τα πρόβατα της Καραγκούνικης φυλής παράγουν γάλα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τη φυλή Lacaune, καθώς σε δύο από τους τρεις μελετηθέντες δείκτες απαιτήσαν μικρότερη ποσότητα δείγματος για να εξουδετερωθεί η ίδια ποσότητα ρίζας. Στη συνολική δραστηριότητα του πρόβειου γάλακτος συμβάλλει σημαντικά το κλάσμα πρωτεΐνης και ιδιαίτερα εκείνο των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, αφού έχει τεκμηριωθεί η *in vitro* cell - free αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών, καθώς και η *in vitro* cell - based προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες σε μυϊκά (C_2C_{12}) και ενδοθηλιακά κύτταρα ($Ea.hy_{926}$) (Kerasioti et al. 2014 ; Kerasioti et al. 2016). Ο επαγόμενος μηχανισμός αφορά το σύστημα Keap1-Nrf2, το οποίο ρυθμίζει ένα σημαντικό επαγόμενο δίκτυο κυτταρικών αντιοξειδωτικών αποκρίσεων. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώθηκε και σε *in vivo* επίπεδο, αυξάνοντας τη σύνθεση γλουταθειόνης στο αίμα και σε διάφορους ιστούς από επίμυες, π.χ. λεπτό έντερο, τετρακέφαλο μυ, πάγκρεας και πνεύμονες (Kerasioti et al. 2018).

Μάλιστα, διαφαίνεται πως αξιοσημείωτο ρόλο στην ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών διαδραματίζει ο τρόπος εκτροφής. Γάλα παραγόμενο από πρόβατα ελευθέρως βοσκής ήταν σημαντικά ισχυρότερο από εκείνο των ενσταβλισμένων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας κατά την οποία παραγωγικά πρόβατα ελευθέρως βοσκής παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές IC50 για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του σχήματος βόσκησης και της πρακτικής διαχείρισης των παραγωγικών ζώων στην αντιοξειδωτική δράση του παραγόμενου γάλακτος (Veskoukis et al. 2020). Αντίθετα, οι περισσότερες μελέτες είναι επικεντρωμένες στην ευεργετική επίδραση της βόσκησης σε πράσινους βοσκοτόπους στην ποιότητα του προϊόντος, συμβάλλοντας σε υψηλότερες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μείωση των κορεσμένων και αύξηση της θρεπτικής αξίας του γάλακτος συγκριτικά με εκείνο που παρήχθη από αποκλειστικά ενσταβλισμένα ζώα (Cabiddu et al. 2005 ; D'urso et al. 2008).

Έχει διατυπωθεί πως η βελτίωση της γενικής κατάστασης της υγείας των προβάτων γαλακτοπαραγωγής και ειδικότερα του μαστικού αδένος είναι απαραίτητη

για την υψηλή παραγωγή, ενώ επηρεάζει και την ποιότητα γάλακτος κατά τη γαλουχία (Martí De Olives et al. 2013). Έτσι, σε επόμενο στάδιο του πειράματος, μελετήθηκε και η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του εκτρεφόμενου ζώου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του προϊόντος προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη δεικτών πρόβλεψης ποιότητας του προϊόντος. Στην περίπτωση της Καραγκούνικης φυλής προβάτων, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC50 εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+} και των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης ($r=-0.5916$, $p= 0.0006$) και ισχυρά θετική με τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης, λιπιδικής υπεροξειδωσης ($r= 0.9359$, $p <0.0001$) και οξείδωσης πρωτεϊνών ($r= 0.9748$, $p <0.0001$). Σχετικά με την αναγωγική ισχύ εμφανίστηκε αρνητική συσχέτιση με τη δραστηριότητα καταλάσης στο αίμα ($r=-0.5013$, $p <0.005$). Συνεπώς, η γλουταθειόνη, η δραστηριότητα της καταλάσης, τα TBARS και τα καρβονύλια μπορούν να αποτελέσουν δείκτες πρόβλεψης της ποιότητας του γάλακτος των ζώων της Καραγκούνικης φυλής.

Στην περίπτωση της γαλακτοπαραγωγού φυλής Lacaune, αποδείχτηκε ισχυρή, θετική συσχέτιση του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS^{•+} τόσο με τον δείκτη υπεροξειδωσης λιπιδίων ($r=0.9572$, $p<0.0001$) όσο και με τον δείκτη των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($r=0.9763$, $p<0.0001$). Ακόμη, προσδιορίστηκε μέση αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην αναγωγική ισχύ και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ($r=-0.6388$, $p=0.0468$) και ισχυρή, θετική, σχεδόν γραμμική σχέση της αδρανοποίησης της ρίζας OH[•] με τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης ($r=0.7113$, $p=0.0211$) και αντίστοιχη αρνητική με τη δραστηριότητα καταλάσης ($r=-0.7163$, $p=0.0198$). Προκύπτει έτσι, πως όλοι οι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα μπορούν να αποτελέσουν δείκτες πρόβλεψης της ποιότητας του γάλακτος των ζώων αυτών.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, πρόβατα της εγχώριας Καραγκούνικης φυλής παρουσίασαν βελτιωμένα τα βασικά επίπεδα των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, καθώς και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στο παραγόμενο γάλα. Ακόμη, διαφάνηκε η ικανότητα πρόβλεψης της ποιότητας του γάλακτος, προσδιορίζοντας συγκεκριμένους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα των ζώων. Αποδεικνύεται εμφανώς το συγκριτικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης γηγενούς φυλής έναντι της γαλλικής Lacaune που τείνει να την αντικαταστήσει. Η δεδομένη πληροφορία ανάγεται σε σπουδαίο επιχείρημα ενίσχυσης του εγχώριου πληθυσμού προβάτων και προτίμησης εκτροφής από κτηνοτροφικούς παραγωγούς, ενώ η επικοινωνία αυτών των στοιχείων στο καταναλωτικό κοινό θα συμβάλει στην

επιλογή προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας, δεδομένης της συσχέτισης των δεικτών στο αίμα με δείκτες ποιότητας στο κρέας και στο γάλα. Σε μεταγενέστερο επίπεδο, θα καταστεί εφικτό να επιτευχθεί εθνική αυτάρκεια χωρίς την ανάγκη εισαγωγής φυλών προβάτων και να ενδυναμωθεί η εξαγωγική και αναπτυξιακή προοπτική της παραγωγής τροφίμων ζωικής προέλευσης. Ακόμη, υποδεικνύεται η ανάγκη διατροφικής συμπλήρωσης της γαλλικής γαλακτοπαραγωγού φυλής, ώστε να βελτιωθεί το οξειδοαναγωγικό προφίλ των προβάτων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από πρόσφατη μελέτη κατά την οποία χορήγηση κουρκουμίνης, μιας ευρέως γνωστής βιοδραστικής ένωσης, προκάλεσε αύξηση δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (S-τρανσφεράση γλουταθειόνης, καταλάση και σουπεροξειδική δισμουτάση) και βελτίωσε την παραγωγική απόδοση και την ποιότητα του γάλακτος (Jaguezeski et al. 2018).

Από όσο είναι γνωστό, το πρόγραμμα αυτό αποτελεί την πρώτη μελέτη που εξετάζει τις παραμέτρους ποιότητας του ελληνικού πρόβειου γάλακτος και το οξειδοαναγωγικό προφίλ σε αίμα παραγωγικών ζώων που δεν έχουν υποβληθεί σε πειραματικές παρεμβάσεις ζωοτροφών. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως το γάλα είναι μια από τις πιο υποσχόμενες τροφές για τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης στον ανθρώπινο οργανισμό, καθίσταται επιβεβλημένη η ανάγκη επικαιροποίησης του παραπάνω ερευνητικού αποτελέσματος με την προσθήκη νέων ζώων και τη μελέτη περισσότερων δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Χαρακτηριστικά θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της δραστικότητας ενζύμων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και την αναγέννηση της γλουταθειόνης (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, αναγωγάση της γλουταθειόνης), προκειμένου να προκύψει ολοκληρωμένη εικόνα της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να γίνει αξιολόγηση και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως βιταμίνες A, C και E, σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια του γάλακτος μέσω ανάλυσης HPLC, μέσω της οποίας θα αποκαλυφθούν τα ακριβή επίπεδα αυτών στο παραγόμενο γάλα των δύο φυλών. Τέλος, επιπρόσθετα ποιοτικά χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να προκύψουν μέσω ανάλυσης της ακολουθίας και εντοπισμού σηματοδοτικών μονοπατιών συμμετοχής των microRNAs που εντοπίζονται στο γάλα των μηρυκαστικών, αφού έχει αποδειχθεί πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μαστικών αδένων, στη γαλουχία και στη βιοσύνθεση γάλακτος και μπορούν να αποτελέσουν δείκτες ποιότητας αυτού (Z. Li et al. 2012 ; Benmoussa and Provost 2019).

6. Βιβλιογραφία

❖ Ξενόγλωσση

- “(2) (PDF) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health.” n.d. Accessed October 9, 2021.
https://www.researchgate.net/publication/236909835_Free_Radicals_Antioxidants_in_Disease_and_Health/figures?lo=1.
- Abuelo, A., J. Hernández, J. L. Benedito, and C. Castillo. 2013. “Oxidative Stress Index (OSi) as a New Tool to Assess Redox Status in Dairy Cattle during the Transition Period.” *Animal* 7 (8): 1374–78.
<https://doi.org/10.1017/S1751731113000396>.
- . 2015. “The Importance of the Oxidative Status of Dairy Cattle in the Periparturient Period: Revisiting Antioxidant Supplementation.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99 (6): 1003–16.
<https://doi.org/10.1111/JPN.12273>.
- Ajuwon, Olawale R., Jeanine L. Marnewick, and Lester M. Davids. 2015. “Rooibos (*Aspalathus Linearis*) and Its Major Flavonoids — Potential Against Oxidative Stress-Induced Conditions.” *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, November. <https://doi.org/10.5772/61614>.
- Akram, Nudrat A., Fahad Shafiq, and Muhammad Ashraf. 2017. “Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance.” *Frontiers in Plant Science* 8 (April): 613.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00613>.
- Al-Wabel, N. A. 2008. “Mineral Contents of Milk of Cattle, Camels, Goats and Sheep in the Central Region of Saudi Arabia.” *Asian Journal of Biochemistry* 3 (6): 373–75. <https://doi.org/10.3923/AJB.2008.373.375>.
- Ali, Syed Saqib, Haseeb Ahsan, Mohammad Khalid Zia, Tooba Siddiqui, and Fahim Halim Khan. 2020. “Understanding Oxidants and Antioxidants: Classical Team

- with New Players.” *Journal of Food Biochemistry* 44 (3): e13145.
<https://doi.org/10.1111/JFBC.13145>.
- Angermüller, Sabine, Markus Islinger, and Alfred Völkl. 2009. “Peroxisomes and Reactive Oxygen Species, a Lasting Challenge.” *Histochemistry and Cell Biology* 131 (4): 459–63. <https://doi.org/10.1007/S00418-009-0563-7/FIGURES/2>.
- Argyriadou, A., A. I. Gelasakis, G. Banos, and G. Arsenos. 2020. “Genetic Improvement of Indigenous Greek Sheep and Goat Breeds.” *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 71 (1): 2063–72.
<https://doi.org/10.12681/JHVMS.22967>.
- Auten, Richard L., and Jonathan M. Davis. 2009. “Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details.” *Pediatric Research* 2009 66:2 66 (2): 121–27. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3181a9eafb>.
- Ayala, Antonio, Mario F Muñoz, and Sandro Argüelles. 2014. “Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.” <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Babior, Bernard M. 2000. “Phagocytes and Oxidative Stress.” *The American Journal of Medicine* 109 (1): 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00481-2).
- Balthazar, C. F., T. C. Pimentel, L. L. Ferrão, C. N. Almada, A. Santillo, M. Albenzio, N. Mollakhalili, et al. 2017a. “Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (2): 247–62.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>.
- . 2017b. “Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (2): 247–62. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>.
- Banos, Georgios, Emily L. Clark, Stephen J. Bush, Prasun Dutta, D. Georgios Bramis, Georgios Arsenos, David A. Hume, and Androniki Psifidi. 2019. “Genetic and Genomic Analyses Underpin the Feasibility of Concomitant Genetic Improvement of Milk Yield and Mastitis Resistance in Dairy Sheep.” *PLoS ONE*

14 (11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0214346>.

- Basiricò, L., P. Morera, D. Dipasquale, A. Tröschler, A. Serra, M. Mele, and U. Bernabucci. 2015. “Conjugated Linoleic Acid Isomers Strongly Improve the Redox Status of Bovine Mammary Epithelial Cells (BME-UV1).” *Journal of Dairy Science* 98 (10): 7071–82. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9787>.
- Becker, Magda M., Gilvanda S. Nunes, Danilo B. Ribeiro, Francisco E.P.S. Silva, Gaëlle Catanante, and Jean Louis Marty. 2019. “Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30 (5): 1108–14. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>.
- Bellezza, Ilaria, Francesca Riuzzi, Sara Chiappalupi, Cataldo Arcuri, Ileana Giambanco, Guglielmo Sorci, and Rosario Donato. 2020. “Reductive Stress in Striated Muscle Cells.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (18): 3547–65. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03476-0>.
- Benmoussa, Abderrahim, and Patrick Provost. 2019. “Milk MicroRNAs in Health and Disease.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18 (3): 703–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12424>.
- Bn, Ames. 1986. “Food Constituents as a Source of Mutagens, Carcinogens, and Anticarcinogens.” *Undefined*.
- Bonekamp, Nina A., Alfred Völkl, H. Dariush Fahimi, and Michael Schrader. 2009. “Reactive Oxygen Species and Peroxisomes: Struggling for Balance.” *BioFactors* 35 (4): 346–55. <https://doi.org/10.1002/BIOF.48>.
- Bouwstra, R J, M Nielen, J R Newbold, E H J M Jansen, H F Jelinek, and T Van Werven. 2010. “Vitamin E Supplementation during the Dry Period in Dairy Cattle. Part II: Oxidative Stress Following Vitamin E Supplementation May Increase Clinical Mastitis Incidence Postpartum.” <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3161>.
- Buffa, Giovanna, Eleni Tsiplakou, Christina Mitsiopolou, Giuseppe Pulina, and Anna Nudda. 2020. “Supplementation of By-Products from Grape, Tomato and Myrtle Affects Antioxidant Status of Dairy Ewes and Milk Fatty Acid Profile.”

- Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 104 (2): 493–506.
<https://doi.org/10.1111/JPN.13315>.
- Butterfield, D. Allan, Tanuja Koppal, Beverly Howard, Ram Subramaniam, Nathan Hall, Kenneth Hensley, Servet Yatin, et al. 1998. “Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-Mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-Tert-Butyl- α -Phenylnitron and Vitamin Ea.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 854 (1): 448–62.
<https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1998.TB09924.X>.
- Cabiddu, A., M. Decandia, M. Addis, G. Piredda, A. Pirisi, and G. Molle. 2005. “Managing Mediterranean Pastures in Order to Enhance the Level of Beneficial Fatty Acids in Sheep Milk.” *Small Ruminant Research* 59 (2-3 SPEC. ISS.): 169–80. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2005.05.005>.
- Carta, A, Sara Casu, and S Salaris. 2009. “Invited Review : Current State of Genetic Improvement in Dairy Sheep.” *Journal of Dairy Science* 92 (12): 5814–33.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2479>.
- Castegna, Alessandra, Jennifer Drake, Chava Pocernich, and D. Allan Butterfield. 2003. “Protein Carbonyl Levels—An Assessment of Protein Oxidation.” *Methods in Biological Oxidative Stress*, November, 161–68.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-424-7:161>.
- Castillo, Cristina, Víctor Pereira, Ángel Abuelo, and Joaquín Hernández. 2013. “Effect of Supplementation with Antioxidants on the Quality of Bovine Milk and Meat Production.” *The Scientific World Journal* 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/616098>.
- Celi, Pietro. 2011. “Oxidative Stress in Ruminants,” 191–231.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-071-3_13.
- Celi, Pietro, and Gianfranco Gabai. 2015. “Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation.” *Frontiers in Veterinary Science* 2 (OCT): 48. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2015.00048/BIBTEX>.
- Chanda, S, and R Dave. 2009. “In Vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation and Some Medicinal Plants Possessing Antioxidant Properties: An Overview.”

African Journal of Microbiology Research 3 (13): 981–96.

<https://doi.org/10.5897/AJMR.9000401>.

Chinnadurai, Kathirvelan, Harpreet Kaur Kanwal, Amrish Kumar Tyagi, Catherine Stanton, and Paul Ross. 2013. “High Conjugated Linoleic Acid Enriched Ghee (Clarified Butter) Increases the Antioxidant and Antiatherogenic Potency in Female Wistar Rats.” *Lipids in Health and Disease* 12 (1): 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-121/TABLES/4>.

Choe, Eunok, and David B. Min. 2009. “Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (4): 345–58. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2009.00085.X>.

Couto, Narciso, Jennifer Wood, and Jill Barber. 2016. “The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network.” *Free Radical Biology and Medicine* 95 (June): 27–42.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.02.028>.

D’urso, S., M. I. Cutrignelli, S. Calabrò, F. Bovera, R. Tudisco, V. Piccolo, and F. Infascelli. 2008. “Influence of Pasture on Fatty Acid Profile of Goat Milk.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (3): 405–10.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0396.2008.00824.X>.

Deavall, Damian G, Elizabeth A Martin, Judith M Horner, and Ruth Roberts. 2012. “Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity.” *Journal of Toxicology* 2012: 13.
<https://doi.org/10.1155/2012/645460>.

DellaPenna, Dean. 2005. “A Decade of Progress in Understanding Vitamin E Synthesis in Plants.” *Journal of Plant Physiology* 162 (7): 729–37.
<https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2005.04.004>.

Dhawan, Veena. 2014. “Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations,” 27–47. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0497-6_2.

Dröge, Wulf. 2002. “Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.” *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2001>.

Economou, Vangelis, Ioannis Ambrosiadis, Alexandros Theodoridis, Aggeliki

- Argyriadou, Theodoros Kalitsis, and Georgios Arsenos. n.d. “A Review of the Quality and Hygiene of Sheep and Goat Meat Produced in Greece.”
- Esterbauer, Hermann, Peter Eckl, Andreas Ortner, and H Esterbauer. 1990. “Possible Mutagens Derived from Lipids and Lipid Precursors.” *Mutation Research*. Vol. 238.
- Fedorova, Maria, Ravi Chand Bollineni, and Ralf Hoffmann. 2014. “Protein Carbonylation as a Major Hallmark of Oxidative Damage: Update of Analytical Strategies.” *Mass Spectrometry Reviews* 33 (2): 79–97.
<https://doi.org/10.1002/MAS.21381>.
- Forman, Henry Jay, Hongqiao Zhang, and Alessandra Rinna. 2009. “Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis.” *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1–2): 1. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2008.08.006>.
- Fransen, Marc, Celien Lismont, and Paul Walton. 2017. “The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why?” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061126>.
- “Free Radicals in Biology and Medicine - Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge - Βιβλία Google.” n.d. Accessed October 9, 2021.
https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=3DIKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=bpkDbZvsjU&sig=NXZRM9Prp3bljotAPu_IWU_rGxI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Galaris, Dimitrios, and Δημήτριος Γάλαρης. 2016. “Ελεύθερες Ρίζες Και Οξειδωτικό Στρες.” *I*, March, 30–31. <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/5113>.
- Gaucher, Caroline, Ariane Id, Justine Boudier, Igor Bonetti, Pierre Clarot, Marianne Leroy, and I D Parent. n.d. “Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies.” <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>.
- Giles, Gregory I., Muhammad Jawad Nasim, Wesam Ali, and Claus Jacob. 2017. “The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On.” *Antioxidants 2017, Vol. 6, Page 38* 6 (2): 38. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX6020038>.
- González-Minero, Francisco José, Luis Bravo-Díaz, and Antonio Ayala-Gómez. 2020. “Rosmarinus Officinalis L. (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in

- Personal Healthcare and Cosmetics.” *Cosmetics* 7 (4): 77.
<https://doi.org/10.3390/COSMETICS7040077>.
- Grażyna, Cichosz, Cieczot Hanna, Ambroziak Adam, and Bielecka Marika Magdalena. 2017a. “Natural Antioxidants in Milk and Dairy Products.” *International Journal of Dairy Technology* 70 (2): 165–78.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12359>.
- . 2017b. “Natural Antioxidants in Milk and Dairy Products.” *International Journal of Dairy Technology* 70 (2): 165–78. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12359>.
- Gruhlke, Martin C.H., and Alan J. Slusarenko. 2012. “The Biology of Reactive Sulfur Species (RSS).” *Plant Physiology and Biochemistry* 59 (October): 98–107.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2012.03.016>.
- Hadjigeorgiou, Ioannis. 2011. “Past, Present and Future of Pastoralism in Greece.”
<https://doi.org/10.1186/2041-7136-1-24>.
- Halliwell, Barry. 2003. “Antioxidants in Human Health and Disease.” [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Nu.16.070196.000341](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Nu.16.070196.000341) 16 (November): 33–50. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU.16.070196.000341>.
- . 2005. “Free Radicals and Other Reactive Species in Disease.” *ELS*, May.
<https://doi.org/10.1038/NPG.ELS.0003913>.
- Halliwell, Barry, and John M.C. Gutteridge. 1990. “[1] Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview.” *Methods in Enzymology* 186 (C): 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B).
- Hampton, Mark B., Anthony J. Kettle, and Christine C. Winterbourn. 1998. “Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing.” *Blood* 92 (9): 3007–17.
https://doi.org/10.1182/BLOOD.V92.9.3007.421K47_3007_3017.
- Hernández-Camacho, Juan D., Michel Bernier, Guillermo López-Lluch, and Plácido Navas. 2018. “Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease.” *Frontiers in Physiology* 9 (FEB): 44.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00044/BIBTEX>.

- Ighodaro, O.M., and O.A. Akinloye. 2018. "First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid." *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4): 287–93.
<https://doi.org/10.1016/J.AJME.2017.09.001>.
- Ihsan, Yudi N. Rizky, K.Bangsa. 2018. "Research Article Research Article." *Archives of Anesthesiology and Critical Care* 4 (4): 527–34.
- Ioana, Simona, Dumitrita Rugina, and Carmen Socaciu. 2012. "Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum Album*)." *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, March.
<https://doi.org/10.5772/26845>.
- Jaguezeski, Antonise M., Gessica Perin, Nathieli B. Bottari, Roger Wagner, Mariane B. Fagundes, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, et al. 2018. "Addition of Curcumin to the Diet of Dairy Sheep Improves Health, Performance and Milk Quality." *Animal Feed Science and Technology* 246 (December): 144–57.
<https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.10.010>.
- Jones, Dean P. 2006. "Redefining Oxidative Stress." *Https://Home.Liebertpub.Com/Ars* 8 (9–10): 1865–79.
<https://doi.org/10.1089/ARS.2006.8.1865>.
- Juan, Celia Andrés, José Manuel Pérez de la Lastra, Francisco J. Plou, and Eduardo Pérez-Lebeña. 2021. "The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (9): 4642. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094642>.
- Kamata, Hideaki, and Hajime Hirata. 1999. "Redox Regulation of Cellular Signalling." *Cellular Signalling* 11 (1): 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00037-0).
- Kawamura, Takuji, and Isao Muraoka. 2018. "Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 7 (9). <https://doi.org/10.3390/antiox7090119>.

- Kerasiotti, Efthalia, Dimitrios Stagos, Vasiliki Georgatzi, Erinda Bregou, Alexandros Priftis, Ioannis Kafantaris, and Dimitrios Kouretas. 2016. "Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6585737>.
- Kerasiotti, Efthalia, Dimitrios Stagos, Alexandros Priftis, Stefanos Aivazidis, Aristidis M. Tsatsakis, A. Wallace Hayes, and Demetrios Kouretas. 2014. "Antioxidant Effects of Whey Protein on Muscle C2C12 Cells." *Food Chemistry* 155 (July): 271–78. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.01.066>.
- Kerasiotti, Efthalia, Dimitrios Stagos, Aristides M. Tsatsakis, Demetrios A. Spandidos, Ioannis Taitzoglou, and Demetrios Kouretas. 2018. "Effects of Sheep/Goat Whey Protein Dietary Supplementation on the Redox Status of Rats." *Molecular Medicine Reports* 17 (4): 5774–81. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.8622/HTML>.
- Khan, Imran Taj, Muhammad Nadeem, Muhammad Imran, Rahman Ullah, Muhammad Ajmal, and Muhammad Hayat Jaspal. 2019a. "Antioxidant Properties of Milk and Dairy Products: A Comprehensive Review of the Current Knowledge." *Lipids in Health and Disease* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/S12944-019-0969-8>.
- . 2019b. "Antioxidant Properties of Milk and Dairy Products: A Comprehensive Review of the Current Knowledge." *Lipids in Health and Disease* 18 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12944-019-0969-8/TABLES/9>.
- Kitsopanidis, George I. 2008. "Effects of Yield Variation and Lambing Period on the Profitability of Certain Sheep Breeds in Greece." *New Medit* 7 (2): 36–40.
- Koren, H. S. 1995. "Associations between Criteria Air Pollutants and Asthma." *Environmental Health Perspectives* 103 (SUPPL. 6): 235–42. <https://doi.org/10.1289/EHP.95103S6235>.
- Kouka, Paraskevi, Fotios Tekos, Kalliopi Valta, Panagiotis Mavros, Aristidis S. Veskoukis, Apostolis Angelis, Alexios Leandros Skaltsounis, and Demetrios Kouretas. 2019. "Olive Tree Blossom Polyphenolic Extracts Exert Antioxidant and Antimutagenic Activities in Vitro and in Various Cell Lines." *Oncology Reports* 42 (6): 2814–25. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7386>.

- Lawrenz, Matthew B, Roger Derek Pechous, Lee-Ann H Allen, Travis Bourret, Joan Meccas, Giang T Nguyen, and Erin R Green. 2017. "Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance Activation and Inhibition of NADPH Oxidase." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* / *Www.Frontiersin.Org* 1: 373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>.
- Leonard, Stephen S., Gabriel K. Harris, and Xianglin Shi. 2004. "Metal-Induced Oxidative Stress and Signal Transduction." *Free Radical Biology and Medicine* 37 (12): 1921–42. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.09.010>.
- Levine, Rodney L., Jakob Moskovitz, and Earl R. Stadtman. 2000. "Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation." *IUBMB Life* 50 (4–5): 301–7. <https://doi.org/10.1080/713803735>.
- Li, Robert, Zhenquan Jia, and Michael A Trush. n.d. "Defining ROS in Biology and Medicine HHS Public Access." <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>.
- Li, Zhen, Hongyun Liu, Xiaolu Jin, Lijian Lo, and Jianxin Liu. 2012. "Expression Profiles of MicroRNAs from Lactating and Non-Lactating Bovine Mammary Glands and Identification of MiRNA Related to Lactation." *BMC Genomics* 13 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-731/FIGURES/11>.
- Limbacher, Melissa R., Megan K. Puglia, Caterina M. Riccardi, and Challa V. Kumar. 2018. "Interlocking Enzymes in Graphene-Coated Cellulose Paper for Increased Enzymatic Efficiency." *Methods in Enzymology* 609 (January): 1–22. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2018.06.012>.
- Littarru, Gian Paolo, and Luca Tiano. 2007. "Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q10: Recent Developments." *Molecular Biotechnology* 2007 37:1 37 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1007/S12033-007-0052-Y>.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra. 2010. "Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health." *Pharmacognosy Reviews* 4 (8): 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- Lu, Shelly C. 2013. "Glutathione Synthesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5): 3143–53.

<https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.09.008>.

Luo, Yulong, Bohui Wang, Chang Liu, Rina Su, Yanru Hou, Duo Yao, Lihua Zhao, Lin Su, and Ye Jin. 2019. “Meat Quality, Fatty Acids, Volatile Compounds, and Antioxidant Properties of Lambs Fed Pasture versus Mixed Diet.” *Food Science and Nutrition* 7 (9): 2796–2805. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1039>.

Lykkesfeldt, Jens, and Ove Svendsen. 2007. “Oxidants and Antioxidants in Disease: Oxidative Stress in Farm Animals.” *The Veterinary Journal* 173 (3): 502–11. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2006.06.005>.

Magnani, Francesca, and Andrea Mattevi. 2019. “Structure and Mechanisms of ROS Generation by NADPH Oxidases.” *Current Opinion in Structural Biology* 59 (December): 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2019.03.001>.

Makri, Sotiria, Ioannis Kafantaris, Salomi Savva, Polyxeni Ntanou, Dimitrios Stagos, Ioannis Argyroulis, Basiliki Kotsampasi, et al. 2018. “Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs.” *In Vivo* 32 (2): 291–302. <https://doi.org/10.21873/invivo.11237>.

Makri, Sotiria, Ioannis Kafantaris, Dimitrios Stagos, Theodora Chamokeridou, Konstantinos Petrotos, Konstantinos Gerasopoulos, Anastasios Mpesios, et al. 2017. “Novel Feed Including Bioactive Compounds from Winery Wastes Improved Broilers’ Redox Status in Blood and Tissues of Vital Organs.” <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.019>.

Margis, Rogerio, Christophe Dunand, Felipe K. Teixeira, and Marcia Margis-Pinheiro. 2008. “Glutathione Peroxidase Family – an Evolutionary Overview.” *The FEBS Journal* 275 (15): 3959–70. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2008.06542.X>.

Martí De Olives, Ana, J. R. Díaz, M. P. Molina, and C. Peris. 2013. “Quantification of Milk Yield and Composition Changes as Affected by Subclinical Mastitis during the Current Lactation in Sheep.” *Journal of Dairy Science* 96 (12): 7698–7708. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6998>.

Masters, Colin, Michael Pegg, and Denis Crane. 1986. “On the Multiplicity of the Enzyme Catalase in Mammalian Liver.” *Molecular and Cellular Biochemistry*

- 70 (2): 113–20. <https://doi.org/10.1007/BF00229426>.
- Mayne, Susan Taylor. 1996. “Beta-carotene, Carotenoids, and Disease Prevention in Humans.” *The FASEB Journal* 10 (7): 690–701.
<https://doi.org/10.1096/FASEBJ.10.7.8635686>.
- Mittler, Ron. 2017. “ROS Are Good.” <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- Moatsou, Golfo, and Lambros Sakkas. 2019. “Sheep Milk Components: Focus on Nutritional Advantages and Biofunctional Potential.” *Small Ruminant Research* 180 (November): 86–99.
<https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2019.07.009>.
- Mohammed Ali, Yassir, Arifah Abdul Kadir, Zuraini Ahmad, Halimatun Yaakub, Zainul Amiruddin Zakaria, and Muhammed Nazrul Hakim Abdullah. 2011. “Pharmaceutical Biology Free Radical Scavenging Activity of Conjugated Linoleic Acid as Single or Mixed Isomers.”
<https://doi.org/10.3109/13880209.2011.621714>.
- Mohapatra, Arpita, Ajay Kumar Shinde, and Raghvendar Singh. 2019. “Sheep Milk: A Pertinent Functional Food.” *Small Ruminant Research* 181 (December): 6–11.
<https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2019.10.002>.
- Molik, Edyta, Genowefa Bonczar, Tomasz Misztal, Aneta Żebrowska, and Dorota Zięba. 2012. “The Effect of the Photoperiod and Exogenous Melatonin on the Protein Content in Sheep Milk.” *Milk Protein*, September.
<https://doi.org/10.5772/46101>.
- Mortensen, Grith, John Sørensen, and Henrik Stapelfeldt. 2002. “Comparison of Peroxide Value Methods Used for Semihard Cheeses.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (18): 5007–11. <https://doi.org/10.1021/JF0200220>.
- Niki, Etsuo. 2014. “Role of Vitamin E as a Lipid-Soluble Peroxyl Radical Scavenger: In Vitro and in Vivo Evidence.” *Free Radical Biology & Medicine* 66 (January): 3–12. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.03.022>.
- . 2016. “Oxidative Stress and Antioxidants: Distress or Eustress?” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 595 (April): 19–24.
<https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.11.017>.

- Oliveira Silva, Eliane de, and Ronan Batista. 2017. "Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (4): 580–616. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12266>.
- Oxidative Stress, X, Antioxidant Nanotherapeutic, Ping Liu, Yixuan Li, Ran Wang, Fazheng Ren, and Xiaoyu Wang. 2021. "Citation: Oxidative Stress and Antioxidant Nanotherapeutic Approaches for Inflammatory Bowel Disease." <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010085>.
- Pappa, Eleni C., Efthymia Kondyli, Kyriaki Sotirakoglou, Loulouda Bosnea, Marios Mataragas, Lynda Allouche, Eleni Tsiplakou, and Athanasios C. Pappas. 2021. "Farmers Profile and Characterization of Sheep and Goat Dairy Chain in Northwestern Greece." *Sustainability (Switzerland)* 13 (2): 1–16. <https://doi.org/10.3390/su13020833>.
- Park, Y. W. 1994. "Hypo-Allergenic and Therapeutic Significance of Goat Milk." *Small Ruminant Research* 14 (2): 151–59. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(94\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0921-4488(94)90105-8).
- Patel, Rakesh P., Joanne McAndrew, Hassan Sellak, C. Roger White, Hanjoong Jo, Bruce A. Freeman, and Victor M. Darley-Usmar. 1999. "Biological Aspects of Reactive Nitrogen Species." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411 (2–3): 385–400. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6).
- Patel, Roma, Lindsey Rinker, Joanna Peng, and William M. Chilian. 2017. "Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad." *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, December. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.71547>.
- Pehlivan, Fadime Eryilmaz. 2017. "Vitamin C: An Antioxidant Agent." *Vitamin C*, August. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.69660>.
- Phaniendra, Alugoju, Dinesh Babu Jestadi, and Latha Periyasamy. 2015. "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30 (1): 11. <https://doi.org/10.1007/S12291-014-0446-0>.

- Pisoschi, Aurelia Magdalena, and Aneta Pop. 2015. "The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (June): 55–74. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2015.04.040>.
- Pizzino, Gabriele, Natasha Irrera, Mariapaola Cucinotta, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Vincenzo Arcoraci, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla, and Alessandra Bitto. 2017. "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- Power, O., P. Jakeman, and R. J. Fitzgerald. 2012. "Antioxidative Peptides: Enzymatic Production, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Potential Applications of Milk-Derived Antioxidative Peptides." *Amino Acids* 2012 44:3 44 (3): 797–820. <https://doi.org/10.1007/S00726-012-1393-9>.
- Priftis, Alexandros, Dimitrios Stagos, Konstantinos Konstantinopoulos, Christina Tsitsimpikou, Demetrios A. Spandidos, Aristides M. Tsatsakis, Manolis N. Tzatzarakis, and Demetrios Kouretas. 2015. "Comparison of Antioxidant Activity between Green and Roasted Coffee Beans Using Molecular Methods." *Molecular Medicine Reports* 12 (5): 7293–7302. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4377/HTML>.
- Puppel, Kamila, Aleksandra Kapusta, and Beata Kuczyńska. 2015. "The Etiology of Oxidative Stress in the Various Species of Animals, a Review." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (11): 2179–84. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7015>.
- Ribas, Vicent, Carmen García-Ruiz, and José C. Fernández-Checa. 2014. "Glutathione and Mitochondria." *Frontiers in Pharmacology* 5 JUL: 151. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00151/BIBTEX>.
- Rizzo, A., M. Pantaleo, M. Mutinati, G. Minoia, C. Trisolini, E. Ceci, and R. L. Sciorsci. 2013. "Blood and Milk Oxidative Status after Administration of Different Antioxidants during Early Postpartum in Dairy Cows." *Research in Veterinary Science* 95 (3): 1171–74. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2013.07.016>.
- Rudling, Axel, Robert Gustafsson, Ingrid Almlöf, Evert Homan, Martin Scobie,

- Ulrika Warpman Berglund, Thomas Helleday, Pål Stenmark, and Jens Carlsson. 2017. "Fragment-Based Discovery and Optimization of Enzyme Inhibitors by Docking of Commercial Chemical Space." *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (19): 8160–69.
https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01006/SUPPL_FILE/JM7B01006_SI_003.ZIP.
- Sadeer, Nabeelah Bibi, Domenico Montesano, Stefania Albrizio, Gokhan Zengin, and Mohamad Fawzi Mahomoodally. 2020. "The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations." *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 709 9 (8): 709.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX9080709>.
- Salvi, Aline, Pierre Alain Carrupt, Jean Paul Tillement, and Bernard Testa. 2001. "Structural Damage to Proteins Caused by Free Radicals: Assessment, Protection by Antioxidants, and Influence of Protein Binding." *Biochemical Pharmacology* 61 (10): 1237–42. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00607-4).
- Sautin, Yuri Y., and Richard J. Johnson. 2008. "URIC ACID: THE OXIDANT–ANTIOXIDANT PARADOX." *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 27 (6): 608. <https://doi.org/10.1080/15257770802138558>.
- Sela, David A, Nauman Khalid, Marco Iammarino, Harjinder Singh, Debashree Roy, Aiqian Ye, and Paul J Moughan. 2020. "Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species-A Review." *Frontiers in Nutrition / Www.Frontiersin.Org* 7: 577759. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759>.
- Sgorlon, S., G. Stradaoli, G. Gabai, and B. Stefanon. 2008. "Variation of Starch and Fat in the Diet Affects Metabolic Status and Oxidative Stress in Ewes." *Small Ruminant Research* 74 (1–3): 123–29.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.04.004>.
- Sharifi-Rad, Mehdi, Nanjangud V. Anil Kumar, Paolo Zucca, Elena Maria Varoni, Luciana Dini, Elisa Panzarini, Jovana Rajkovic, et al. 2020. "Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases." *Frontiers in Physiology* 0 (July): 694.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00694>.

- Shi, Xianglin, Zigang Dong, Nar S. Dalal, and Peter M. Gannett. 1994. "Chromate-Mediated Free Radical Generation from Cysteine, Penicillamine, Hydrogen Peroxide, and Lipid Hydroperoxides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1226 (1): 65–72. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90060-4).
- Sies, Helmut. 1991. "Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application." *The American Journal of Medicine* 91 (3): S31–38. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2).
- . 2015. "Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine." *Redox Biology* 4 (April): 180–83. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.01.002>.
- . 2018. "On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development." *Current Opinion in Toxicology* 7 (February): 122–26. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2018.01.002>.
- Singh, Anju, Ritushree Kukreti, Luciano Saso, and Shrikant Kukreti. 2019. "Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases." *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1583 24 (8): 1583. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24081583>.
- Skaperda, Zoi, Aristidis S. Veskokoukis, and Demetrios Kouretas. 2019. "Farm Animal Welfare, Productivity and Meat Quality: Interrelation with Redox Status Regulation and Antioxidant Supplementation as a Nutritional Intervention (Review)." *World Academy of Sciences Journal* 1 (4): 177–83. <https://doi.org/10.3892/WASJ.2019.19>.
- Sochor, Jiri, Branislav Ruttkay-Nedecky, Petr Babula, Vojtech Adam, Jaromir Hubalek, and Rene Kizek. 2012. "Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation." *Lipid Peroxidation*, August. <https://doi.org/10.5772/45945>.
- Sonthalia, Sidharth, Deepashree Daulatabad, and Rashmi Sarkar. 2016. "Glutathione as a Skin Whitening Agent: Facts, Myths, Evidence and Controversies." *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 82 (3): 262–72. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.179088>.
- Sretenović, Lj., S. Aleksić, M.P. Petrović, and B. Mišćević. 2007. "Nutritional Factors

- Influencing Improvement of Milk and Meat Quality as Well as Productive and Reproductive Parameters of Cattle.” *Biotechnology in Animal Husbandry* 23 (5-6-1): 217–26. <https://doi.org/10.2298/BAH0701217S>.
- Srivastava, Ruby. 123AD. “Physicochemical, Antioxidant Properties of Carotenoids and Its Optoelectronic and Interaction Studies with Chlorophyll Pigments.” *Scientific Reports* / 11: 18365. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97747-w>.
- Stahl, Wilhelm, and Helmut Sies. 2003. “Antioxidant Activity of Carotenoids.” *Molecular Aspects of Medicine* 24 (6): 345–51. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X).
- Stojković, Biljana, and Mirko Đorđević. 2017. “Interaction between Mitochondrial and Nuclear Genomes: The Role in Life-History Evolution.” *Biologia Serbica* 39 (1): 32–40. <https://doi.org/10.5281/zenodo.826619>.
- Sundl, Isabella, Michael Murkovic, Donata Bandoniene, and Brigitte M. Winklhofer-Roob. 2007. “Vitamin E Content of Foods: Comparison of Results Obtained from Food Composition Tables and HPLC Analysis.” *Clinical Nutrition* 26 (1): 145–53. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2006.06.003>.
- Surai, Peter F, Ivan I Kochish, Vladimir I Fisinin, and Darren T Juniper. 2019. “Revisiting Oxidative Stress and the Use of Organic Selenium in Dairy Cow Nutrition.” *Animals* 9: 462. <https://doi.org/10.3390/ani9070462>.
- Szweda, Pamela A., Bertrand Friguet, and Luke I. Szweda. 2002. “Proteolysis, Free Radicals, and Aging.” *Free Radical Biology and Medicine* 33 (1): 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00837-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00837-7).
- Thomas, David L., Yves M. Berger, Brett C. McKusick, and Claire M. Mikolayunas. 2014. “Dairy Sheep Production Research at the University of Wisconsin-Madison, USA - A Review.” *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-22/TABLES/11>.
- Traber, Maret G, and Jeffrey Atkinson. 2007. “Vitamin E, Antioxidant and Nothing More.” <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>.
- Treml, Jakub, and Karel Šmejkal. 2016. “Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*

15 (4): 720–38. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>.

Tsartsianidou, Valentina, Vanessa Varvara Kapsona, Enrique Sánchez-Molano, Zoitsa Basdagianni, Maria Jesús Carabaño, Dimitrios Chatziplis, Georgios Arsenos, Alexandros Triantafyllidis, and Georgios Banos. 2021. “Understanding the Seasonality of Performance Resilience to Climate Volatility in Mediterranean Dairy Sheep.” *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-81461-8>.

Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T D Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. 2007. “Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

Veskoukis, Aristidis S., Aristidis M. Tsatsakis, and Dimitrios Kouretas. 2011. “Dietary Oxidative Stress and Antioxidant Defense with an Emphasis on Plant Extract Administration.” *Cell Stress and Chaperones* 2011 17:1 17 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1007/S12192-011-0293-3>.

Viña, Jose, Viñ Viña, Mari-Carmen Gomez-Cabrera, Ana Lloret, Rafael Marquez, Juan B Miñana, Miñ Miñana, Federico V Pallardó, and Juan Sastre. 2000. “Critical Review Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants.” *IUBMB Life*. Vol. 50.

Vossen, E, M Ntawubizi, K Raes, K Smet, G Huyghebaert, S Arnouts, and S De Smet. n.d. “Effect of Dietary Antioxidant Supplementation on the Oxidative Status of Plasma in Broilers.” <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01041.x>.

Warraich, Umm e.Ammara, Fatma Hussain, and Haroon Ur Rashid Kayani. 2020. “Aging - Oxidative Stress, Antioxidants and Computational Modeling.” *Heliyon* 6 (5): e04107. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04107>.

Yin, Huiyong, Libin Xu, and Ned A. Porter. 2011. “Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis.” *Chemical Reviews* 111 (10): 5944–72. <https://doi.org/10.1021/CR200084Z>.

Z, Skaperda, Argyriadou A, Nechaloti PM, Alvanou M, Makri S, Bouroutzika E, Kyriazis ID, et al. 2021. “Redox Biomarker Baseline Levels in Cattle Tissues

and Their Relationships with Meat Quality.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*.
Antioxidants (Basel). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10060958>.

Zhang, Hua, and Rong Tsao. 2016. “Dietary Polyphenols, Oxidative Stress and Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects.” *Current Opinion in Food Science* 8 (April): 33–42. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2016.02.002>.

Zhao, Ru Zhou, Shuai Jiang, Lin Zhang, and Zhi Bin Yu. 2019. “Mitochondrial Electron Transport Chain, ROS Generation and Uncoupling (Review).” *International Journal of Molecular Medicine* 44 (1): 3–15.
<https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188/HTML>.

❖ Ελληνόγλωσση

“Εισαγωγή Στη Ζωοτεχνία.” n.d.

“ΖΩΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ.” 2011.

“Κεφάλαιο 8: Αντιδράσεις Ριζών.” n.d.

N. Παπαγαλάνης. 2014. “Οξειδωτικό Στρες Και Ενδογενές Αντιοξειδωτικό Σύστημα. I. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου.” *Ελληνική Νεφρολογία* 26 (3): 151–94.