ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΤΑΜΠΙΝΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΕΓΚΥΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

REDOX STATUS AFTER VACCINATION OF PREGNANT EWES

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βαλάση Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής

Αθανασίου Λαμπρινή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής

Περίληψη

Το οξειδωτικό στρες αντικατοπτρίζει την ανισορροπία μεταξύ της συστημικής έκφρασης των δραστικών μορφών οξυγόνου και την ικανότητα ενός βιολογικού συστήματος να αποτοξινώνει με ευχέρεια τις ενδιάμεσες δραστικές μορφές και να επιδιορθώνει την προκύπτουσα βλάβη. Στις προβατίνες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τόσο ο μητρικός όσο και ο εμβρυικός οργανισμός εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό, πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση της χορήγησης αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E ή/και το σελήνιο στην ανοσοαπόκριση εγκύων και μη εγκύων προβατίνων ύστερα από εμβολιασμό. Ωστόσο, είναι περιορισμένα τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση του εμβολιασμού στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των προβατίνων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η αξιολόγηση της διακύμανσης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά τη χορήγηση της ετήσιας αναμνηστικής δόσης πολυδύναμου εμβολίου για την πρόληψη κλωστριδιακών λοιμώξεων σε έγκυες προβατίνες με ή χωρίς ταυτόχρονη χορήγηση βιταμίνης Ε και σεληνίου (Vit E/Se). Στη μελέτη συμμετείχαν 24 προβατίνες φυλής Lacaune, ηλικίας 2 έως 4 χρονών, στον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης. Οι προβατίνες χωρίστηκαν σε τέσσερις ισάριθμες ομάδες: στην ομάδα V, στην οποία πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός έναντι κλωστριδιακών λοιμώξεων, στην ομάδα VE, που έγινε εμβολιασμός έναντι κλωστριδιακών λοιμώξεων και χορήγηση βιταμίνης E/Se, στην ομάδα E, που έγινε μόνο χορήγηση βιταμίνης E/Se και στην ομάδα C, που περιλάμβανε τα ζώα μάρτυρες. Η περίοδος μελέτης διήρκεσε 21 ημέρες, ξεκινώντας την ημέρα των εγχύσεων. Για τη μελέτη βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης πραγματοποιήθηκαν συνολικά 9 αιμοληψίες απ' όλες τις προβατίνες. Η πρώτη αιμοληψία έγινε αμέσως πριν την έναρξη των χορηγήσεων (0h), στη συνέχεια στις 12 (12h), 24 (D1) και 48 ώρες (D2), κι έπειτα τις ημέρες 4 (D4), 6 (D6), 10 (D10), 14 (D14) και 21 (D21) μετά τις χορηγήσεις. Οι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μελετήθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η TAC ήταν ο μόνος δείκτης που διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων και παρουσίασε μείωση στα ζώα που εμβολιάστηκαν (ομάδες V και VE) σε σχέση με αυτά που δεν εμβολιάστηκαν (ομάδες E και C). Επίσης, αύξηση των επιπέδων της GSH καταγράφηκε 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό στην ομάδα E, η οποία παρέμεινε αυξημένη έως την D4 ($p<0,05$). Η απουσία αύξησης των τιμών TBARS μετά τον εμβολιασμό στις ομάδες V και VE υποδηλώνει την απουσία οξειδωτικού στρες. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι ο ετήσιος αναμνηστικός εμβολιασμός των προβατίνων, στον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης τους, κατά κλωστριδιακών λοιμώξεων δεν προκαλεί ισχυρό οξειδωτικό στρες στις έγκυες προβατίνες.

Λέξεις κλειδία: προβατίνες, οξειδοαναγωγικό προφίλ, πολυδύναμο εμβόλιο Κλωστριδιακών στελεχών, εγκυμοσύνη, βιταμίνη E, σελήνιο

Abstract

The oxidative stress reflects an imbalance between the systemic expression of reactive oxygen species and the ability of a biological system to detoxify fluently reactive intermediates and repair the resulting damage. During pregnancy in sheep, both the maternal and fetal organisms are exposed to oxidative stress caused by the increased amount of reactive oxygen species. Based on this fact, many researchers have evaluated the impact of the supplementation of antioxidants, such as vitamin E and/or selenium, on the immune response of pregnant or non-pregnant sheep after vaccination. Nevertheless, there is still limited and quite loose knowledge about the effect of vaccination on the redox status of pregnant ewes. Thus, the present study was designed to evaluate the fluctuation of redox status after the administration of the annual booster dose of a polyvalent clostridial vaccine in pregnant ewes, 3 to 4 weeks before lambing, with or without a simultaneous injection of vitamin E and selenium (Vit E/Se). In total 24 pregnant Lacaune ewes 3-4 weeks before lambing were randomly allocated into 4 groups: the V (vaccinated with a polyvalent clostridial vaccine), VE (vaccinated and injected IM with Vit E/Se), E (injected IM with Vit E and Se) and C (neither vaccinated nor injected with Vit E/Se). The study period lasted for 21 days, started at the day of administrations. Four redox biomarkers, the antioxidant capacity (TAC), the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the reduced glutathione (GSH) and the catalase (CAT) were evaluated in blood samples collected from all ewes before the injections (0h) and then at 12 (12h), 24 (D1) and 48 hours (D2), and thereafter on days 4 (D4), 6 (D6), 10 (D10), 14 (D14) and 21 (D21). The results revealed that TAC was the only biomarker evaluated that was significantly affected by group and was significantly lower in vaccinated animals (V and VE groups) compared to non-vaccinated (E and C groups). Also, an increase of GSH levels was estimated 24h post vaccination in group E, which remained elevated until the D4 ($p<0.05$). The absence of increase in TBARS values after vaccination in groups V and VE indicates the absence of significant oxidative stress. Overall, it can be assumed that annual booster immunization against clostridial diseases do not impose pregnant ewes at the last month of pregnancy in acute oxidative stress.

Keywords: ewes; redox status; polyvalent clostridial vaccine; pregnancy; vitamin E; selenium

Περιεχόμενα

Πίνακας Περιεχομένων για τις εικόνες

Πίνακας Περιεχομένων για τους πίνακες

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε ένα ατομικό τροχιακό. Η ελεύθερη ρίζα μπορεί να δημιουργηθεί μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων καθώς και μέσω ομολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού που ακολουθείται από διαμοιρασμό του ζεύγους των ηλεκτρονίων (Halliwell, 2007). Ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων μιας ελεύθερης ρίζας την καθιστά ασταθή και εξαιρετικά αντιδραστική, γεγονός που οδηγεί στη συμμετοχή της σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια.

Μια ελεύθερη ρίζα, λόγω της υψηλής αντιδραστικότητάς της, μπορεί να αφαιρέσει ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις για να επιτύχει σταθερότητα. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Mukherji & Singh, 1986). Η αναστολή αυτών των αλυσιδωτών αντιδράσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τον σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού από την αντίδραση δύο ελεύθερων ριζών, μία διαδικασία σπάνια, είτε από την αντίδραση μίας ελεύθερης ρίζας με ένα άλλο μόριο και τον σχηματισμό μίας μη δραστικής ελεύθερης ρίζας.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές μορφές με κεντρικό άτομο το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS), το άζωτο (Reactive Nitrogen Species, RNS), το θείο (Reactive Sulphur Species, RSS) και το χλώριο (Reactive Chlorine Species, RCS). Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διττό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς (Veskoukis et al., 2012). Σε μέτριες ή χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ευεργετικά αποτελέσματα και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στη φαγοκυττάρωση από κύτταρα του ανοσοποιητικού, σε μια σειρά από οδούς σηματοδότησης, στη μεταγραφή γονιδίων, στην απόπτωση και στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Valko et al., 2007; Nordberg and Arner, 2001). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσβάλλουν διάφορα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων (Yla-Herttuala, 1999), των πρωτεϊνών (Stadtman and Levin, 2000) και του DNA (Marnett, 2000) που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες.

Αναλυτικότερα οι ROS περιλαμβάνουν δραστικές ενώσεις που προκύπτουν ως ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου και αποτελούνται τόσο από ελεύθερες ρίζες όσο και από μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου (Li et al., 2016). Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Υπάρχουν όμως και κάποιες ενώσεις του οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το μοριακό οξυγόνο, οι οποίες αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες συμπεριφέρονται όπως αυτές, επειδή χημικά είναι πολύ δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Miller et al., 1990). Οι κυριότερες ROS (Aqil et al., 2012; AICR, 2007) είναι: το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), η ρίζα υπεροξειδίου

(ROO$^{\bullet}$), το μονήρες οξυγόνο ($^1O_2$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2),τα οργανικά υπεροξείδια (ROOH) και το όζον (O_3).

Ειδικότερα, το ίδιο το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα που χρησιμοποιούν οι αερόβιοι οργανισμοί αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (triplet state), παρουσιάζει μικρή οξειδωτική ικανότητα. Ώστόσο, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (singlet state) και συμβολίζεται με $^*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell, 2001).

Οι Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) αποτελούν μία γενική κατηγορία δραστικών ενώσεων που έχουν πρωτογενή πηγή το μονοξείδιο του αζώτου (Giles et al., 2007). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν: το μονοξείδιο του αζώτου (NO*),το διοξείδιο του αζώτου (NO_2*), το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$) και το υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH)

Ειδικότερα, παρότι το μονοξείδιο του αζώτου έχει δραστικότητα παρόμοια με εκείνη του οξυγόνου, η αντίδραση του με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) προκαλεί αντιδράσεις οξείδωσης, νίτρωσης, νιτροποίησης και νιτροσυλίωσης σε βιολογικά μόρια καθιστώντας τον καθοριστικό παράγοντα στην κυτταρική σηματοδότηση (Patel et al., 1999).

Οι Δραστικές Μορφές Θείου (Rreactive Sulphur Species, RSS) περιλαμβάνουν ενώσεις που περιέχουν ως κεντρικό άτομο το θείο σε υψηλή οξειδωτική κατάσταση. Αναλυτικότερα περιλαμβάνουν (Gruhlke & Slusarenko, 2012): το δισουλφίδιο (RSSR), το σουλφενικό οξύ (RSOH), το σουλφινικό οξύ (RSO_2H) και τη ρίζα θειυλίου (RS*)

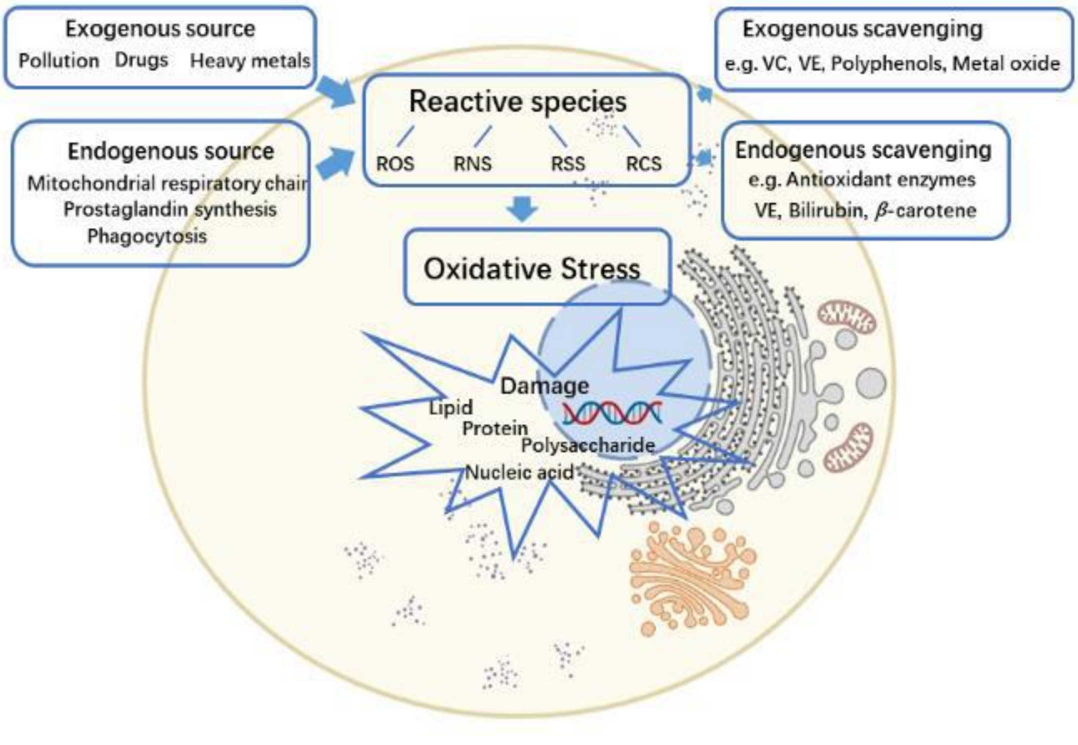
Οι Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS) περιλαμβάνουν τις εξής ενώσεις: το υποχλωριώδες οξύ (HClO), το υποχλωριώδες ανιόν (OCl^-) και τη χλωραμίνη (RNHCl).

Ειδικότερα, το υποχλωριώδες οξύ (HClO) είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με θειολικές ομάδε,ς οδηγώντας στον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων (Li et al., 2016).

1.2 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Klatt & Lamas, 2000). Η περίσσεια των δραστικών μορφών προκαλεί βλάβες στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τους. Κατά συνέπεια, το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθογένεια πολλών νοσημάτων καθώς και στη διαδικασία της γήρανσης. Η λεπτή ισορροπία ανάμεσα στις ευεργετικές και τις βλαβερές δράσεις των ελεύθερων ριζών έχει ιδιαίτερη σημασία για τους ζωντανούς οργανισμούς και διαφυλάσσεται με μηχανισμούς γνωστούς ως «οξειδοαναγωγική ρύθμιση» (redox regulation). Η οξειδοαναγωγική ρύθμιση διατηρεί την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και προστατεύει τους ζώντες οργανισμούς από το οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα μάλιστα με έναν νεότερο ορισμό, το οξειδωτικό stress μπορεί να οριστεί ως η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης. (Johns DP, 2006)

Ο Helmut Sies επαναδιατύπωσε το οξειδωτικό στρες ως «τη διαταραχή προ-οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη» (Sies, 2015). Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς έχουν συνδεθεί με τη διατάραξη φυσιολογικών σηματοδοτικών μονοπατιών, καθώς και με βλάβη μακρομορίων (Veskoukis et al., 2011). Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για εντατικές έρευνες με σκοπό την κατανόηση των επιπτώσεων των ελευθέρων ριζών, αλλά και την πρόληψη και αντιμετώπιση αυτών μέσα από τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών των τροφίμων και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών διαφόρων ζωικών οργανισμών.



Εικόνα 1: Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών (Hernández-Camacho et al., 2018).

1.3 Αντιοξειδωτικά συστήματα

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία η οποία καθυστερεί ή δύναται να αναστείλει την οξείδωση υποστρωμάτων και εντοπίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα (Halliwell and Gutteridge 2015). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί, ενώ διακρίνονται σε αυτά που συνθέτονται *in vivo* από τον ίδιο τον οργανισμό (ενδογενή αντιοξειδωτικά) και σε αυτά που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εμποδίζουν τον σχηματισμό ριζών, να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες μετατρέποντάς τες σε λιγότερο δραστικά μόρια και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Gomes et al., 2011).

1.3.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου σύμφωνα με την αντίδραση:

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Η υπεροξειδική δισμουτάση απαντάται σε τρεις ισομορφές στον άνθρωπο με τις δύο να εντοπίζονται ενδοκυτταρικά και η τρίτη στον εξωκυττάριο χώρο. Οι τρεις ισομορφές της SOD διαφέρουν ως προς το μέταλλο στο ενεργό τους κέντρο. Συγκεκριμένα τα ενεργά κέντρα των ισομορφών SOD στο κυτταρόπλασμα και στον εξωκυττάριο χώρο περιέχουν μέταλλα όπως ο χαλκός και ο ψευδάργυρος (Cu/Zn-SOD), ενώ το ενεργό κέντρο της ισομορφής SOD στα μιτοχόνδρια περιέχει μαγγάνιο (Mn-SOD). Η $O_2^{\cdot -}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ όταν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα (Pandey and Rizvi, 2010).

Καταλάση (CAT), απαντάται στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Ένα μόριο καταλάσης έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου ανά λεπτό, ωστόσο έχει μικρότερη συγγένεια με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε σύγκριση με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Gomes et al., 2012).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Οι διαφορές των ισομορφών της GPx έγκειται στο ότι η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο, ενώ η άλλη μορφή είναι ανεξάρτητη. Οι ισομορφές της GPx, επίσης, διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων που περιέχουν, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο και τους μηχανισμούς κατάλυσης. Σε αντιστοιχία με την καταλάση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2) χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται (Antunes et al. 2002), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

Η GPx ενεργοποιείται όταν το H_2O_2 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η καταλάση δρα όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι υψηλή (Halliwell and Gutteridge 2015). Επιπλέον, τα επίπεδα GPx και CAT διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Για παράδειγμα, στον εγκέφαλο έχουν ανιχνευθεί χαμηλά επίπεδα δραστικότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστικότητας GPx, ενώ στο ήπαρ υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων (Gomes et al., 2012; Jackson, 2010).

Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), καταλύει την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) κι έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα το λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά. Η GR χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Η φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι, σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GR (Lu et al., 2010):

$$NADPH + H^+ + GSSH \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

1.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Κατά την αντίδραση μίας δραστικής μορφής με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, οι οποίες μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσουν με άλλα μόρια παράγοντας ακόμα περισσότερες ελεύθερες ρίζες σε μία αλυσιδωτή αντίδραση. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα δύναται να διακόψουν αυτές τις αντιδράσεις, είτε λαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από την ελεύθερη ρίζα, είτε με προσφορά ηλεκτρονίων προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετατρέπονται τα ίδια σε ρίζες. Όμως οι ρίζες των αντιοξειδωτικών είναι λιγότερο επικίνδυνες και σχετικά αδρανείς. Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα ανήκουν η γλουταθειόνη, το α-λιποϊκό οξύ, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, το συνένζυμο Q10-ουβικινόνη, οι θειοαναγωγάσες TrRX, η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, τα μέταλλα και οι μεταλλοθειονίνες (Lu et al., 2010).

Γλουταθειόνη, είναι ένα τριπεπτίδιο με αναγωγικές ιδιότητες το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μεταφέρεται στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας. Απαντάται σε δύο μορφές, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη μορφή (GSSG) και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσης μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης. Η συγκέντρωση της γλουταθειόνης στα κύτταρα ποικίλει μεταξύ των οργάνων ανάλογα με τη λειτουργία τους. Ιστοί με υψηλή έκθεση σε οξειδωτικά περιέχουν υψηλά επίπεδα της οξειδωμένης μορφής της, ενώ σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε οξειδωτικό στρες βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή της. Εκτός από τη χρήση της ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων δια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, δεσμεύει τη ρίζα του υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο, μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου, χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων. Τέλος δύναται να επαναφέρει αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η βιταμίνη C και E, στην ενεργό μορφή τους (Jackson, 2010).

Α-λιποϊκό οξύ, είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που μπορεί να προσληφθεί από μία ποικιλία τροφών. Δρα ως συμπαράγοντας της αφυδρογονάσης και στην αναχθείσα μορφή του (διυδρολιποικό οξύ) μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικό (Jackson, 2010).

Ουρικό οξύ, είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο και είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικό το οποίο φαίνεται να αποτελεί ισχυρό εκκαθαριστή των υπεροξυλικών ριζών, των ριζών υδροξυλίου και του μονήρους οξυγόνου. Επίσης, το ουρικό οξύ είναι σε θέση να προστατεύσει από την οξειδωτική βλάβη με προσφορά ηλεκτρονίων σε άλλες ουσίες, με αποτέλεσμα την αναγωγή τους. Ακόμα είναι σε θέση να μετατρέψει ιόντα μετάλλων, όπως του χαλκού και του σιδήρου, σε χηλικά μέταλλα με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η κατάλυση των υδροξυλικών ριζών με τις αντιδράσεις Fenton (Jackson, 2010).

Χολερυθρίνη, είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού τη αίμης και έχει φανεί ότι διαθέτει ισχυρό αντιοξειδωτικό μηχανισμό έναντι των υπεροξυλικών ριζών και προστατεύει τα κύτταρα από τα τοξικά επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Jackson, 2010).

Συνένζυμο Q10, αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλει στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell and Gutteridge 2015).

Βιταμίνη C, είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου. Επίσης, συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως της βιταμίνη E και του σεληνίου. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι ιδιαίτερα έκδηλη στους πνεύμονες και στον κρυσταλλοειδή φακό του οφθαλμού (Fang et al., 2002).

Βιταμίνη Ε, είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης Ε στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη Ε λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση (Halliwell & Gutteridge, 1998). Στα ζώα η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης Ε ενισχύει την κυτταρική ανοσία με τη μεσολάβηση των Τ-λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων, του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων. Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας των φυσικών φονικών κυττάρων (NKC) και της φαγοκυτταρικής ικανότητας των μακροφάγων, ενισχύονται από τη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης Ε (Lewis et al., 2018).

Καροτενοειδή, πρόκειται για χρωστικές, που απαντώνται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντώνται περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο (Edge et al., 1997).

Μέταλλα, όπως το σελήνιο (Se), ο χαλκός, ο ψευδάργυρος. Ειδικότερα το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία και βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της GPx και με αυτόν τον τρόπο συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα (Halliwell and Gutteridge 2015). Συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα σεληνίου συνδέονται με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς είναι σημαντικό για τη χημειοτακτική και τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Όσον αφορά τη δραστηριότητα των μακροφάγων, το Se μετριάζει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των ROS, μειώνει την αντιγραφή του παθογόνου ενδοκυτταρικά, ενισχύει τον αριθμό των μακροφάγων και το φαγοκυτταρικό τους δυναμικό. Η επίκτητη ανοσία επηρεάζεται επίσης από την πρόσληψη σεληνίου, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης και των λειτουργιών των Τ- και Β- λεμφοκυττάρων (Pecoraro et al., 2022).

Μεταλλοθειονίνες. Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό στρες. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του Cu^{2+} και του Zn^{2+}, στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως του Cu (Halliwell and Gutteridge 2015).

Πίνακας 1: Αντιοξειδωτικά (Knight, 2000)

Ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	**Τροφή ή συμπληρώματα διατοφής**

Χαλκού/ψευδαργύρου (Cu/Zn) υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Βιταμίνη C
Καταλάση (CAT)	Βιταμίνη Ε
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	Β-καροτένιο
Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)	Ψευδάργυρος
	Σελήνιο

1.4 Βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικά μόρια που αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού. Η αλληλεπίδραση τους με λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA επιφέρει τροποποίηση της δομής ή ακόμη αι καταστροφή τους, με αποτέλεσμα η λειτουργικότητά τους να μεταβάλλεται ή να χάνεται πλήρως. Αυτές οι διαταραχές έχουν συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση ακόμα και με νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις στο μόριο του DNA οφείλονται στη ρίζα του υδροξυλίου, η δράση της οποίας επιφέρει θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA, αλλαγές στις αζωτούχες βάσεις και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, ενεργοποιώντας τη λειτουργία της πολυμεράσης της ριβόζης. Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην επισκευή, τη μετάφραση, την αντιγραφή και τον ανασυνδυασμό του DNA. Η τροποποίηση του γενετικού υλικού μπορεί να αποτελέσει το πρώτο βήμα στην πρόκληση μεταλλάξεων, την καρκινογένεση και την εμφάνιση κληρονομικών ασθενειών (Juan *et al.*, 2021).

Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί αλλοιώσεις και τροποποιήσεις στη δομή τους, με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Όταν ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα αμινοξέα, παράγονται οξειδωμένα αμινοξέα και πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία χρησιμοποιούνται και ως δείκτες οξειδωτικού στρες, καθώς και ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής καταστροφής. Κύριοι στόχοι των ελεύθερων ριζών είναι η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη, η θρεονίνη, τα οποία μετατρέπονται σε αλδεϋδικές και κετονικές ομάδες, καθώς και οι θειολικές ομάδες του καταλοίπου της κυστεΐνης, που οξειδώνονται σε θειολικές ρίζες ($RS^{\bullet}$) και δημιουργούνται τελικά είτε πιο δραστικές ρίζες είτε δισουλφιδικοί δεσμοί (Salvi *et al.*, 2001).

Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα των μεμβρανικών λιπιδίων, αντιδράσεις που μπορεί να καταλήξουν σε λιπιδική υπεροξείδωση. Η λιπιδική υπεροξείδωση ορίζεται ως η παραγωγή νέων ριζών. Έτσι, η κυτταρική μεμβράνη χάνει την σταθερότητα της, αποσταθεροποιούνται οι μεμβρανικοί υποδοχείς και επιπλέον προκαλείται ανοσολογική απόκριση, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των λιπιδίων σε φωσφολιπίδια, γεγονός που σταδιακά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Young & McEneny, 2001). Από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, εκτός από τα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια (LOOH), είναι δυνατό να προκύψουν και δευτερογενή προϊόντα, όπως η μαλονδιαλδεΰδη (MDA) και η 4-υδροξυενενάλη (4-HNE), που θεωρούνται τα πιο μεταλλαξιγόνα και τοξικά προϊόντα της διαδικασίας, αντίστοιχα (Esterbauer *et al.*, 1990).

1.5 Οξειδωτικό στρες και ανοσοποιητικό σύστημα

Όλα τα θηλαστικά διαθέτουν δύο γραμμές άμυνας, την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία. Οι δύο τύποι ανοσίας λειτουργούν συντονισμένα έτσι ώστε να περιορίσουν και στη συνέχεια να εξαλείψουν τους βλαβερούς παράγοντες. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία είναι τα μονοκύτταρα (μονοπύρηνα φαγοκύτταρα), τα ουδετερόφιλα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NKC). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος ως τον κύριο μηχανισμό, καθώς και διάφορες πρωτεΐνες αναγνώρισης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σε θέση να δεσμεύουν δομές υδατανθράκων που υπάρχουν στα βακτήρια, αλλά όχι στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα NK κύτταρα, η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ιών, όχι μόνο αυξάνονται με την πάροδο της ηλικίας αλλά παραμένουν λειτουργικά ενεργά. Η επίκτητη ανοσία περιλαμβάνει ορισμένους υποτύπους λεμφοκυττάρων, ενώ τα αντισώματα που παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα λειτουργούν ως τελεστές για την καταστροφή πολύ ειδικών ξένων αντιγόνων. Τα Β-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μερικές σχετικά απλές χημικές δομές, ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν μόνο πεπτίδια (Knight, 2000).

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία. Η οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία (oxidant antioxidant balance) είναι κρίσιμη για τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων, επειδή διατηρεί την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και τις πρωτεΐνες και τα νουκλεικά οξέα των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, αυτή η ισορροπία είναι σημαντική για τον έλεγχο της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης, λειτουργίες που θεωρούνται κρίσιμες για τη διατήρηση της κανονικής λειτουργίας των ανοσοκυττάρων και της ικανότητάς τους να αμύνονται έναντι διαφόρων ξένων αντιγόνων. Τα ανοσοκύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες λόγω του υψηλού ποσοστού πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες τους, που είναι πολύ ευπαθή σε υπεροξείδωση, και λόγω της υψηλής παραγωγής ROS, που αποτελεί μέρος της φυσιολογικής λειτουργίας τους. Οι μικροβιοκτόνες λειτουργίες των ανοσοκυττάρων, όπως είναι η κυτταροτοξική δράση και η φαγοκυττάρωση, συνδέονται ειδικά με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Knight, 2000). Κατά τη φαγοκυττάρωση ενεργοποιείται μια ακολουθία κυτταρικών οδών σηματοδότησης, τμήμα της οποίας είναι και η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης 2, με αποτέλεσμα την παραγωγή της ρίζας του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Magnani and Mattevi, 2019). Μάλιστα, κατά τη διέγερση των φαγοκυττάρων αυξάνεται στο εκατονταπλάσιο η κατανάλωση οξυγόνου και κατ΄ επέκταση η παραγωγή της ρίζας $O_2^{\cdot-}$, φαινόμενο γνωστό ως "αναπνευστική ή οξειδωτική έκρηξη". Στη συνέχεια, το υποπροϊόν $O_2^{\cdot-}$ που παράγεται 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 οδηγήσει στην παραγωγή της άκρως δραστικής μορφής υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$). Ωστόσο, οι δραστικές μορφές $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 δεν είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και δεν επαρκούν για την αποτελεσματική εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Για την ενίσχυση της άμυνας, απελευθερώνονται και κυστίδια που, εκτός άλλων, περιέχουν το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO), που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το H_2O_2 και οξειδώνει ιόντα χλωρίου για την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (HOCl), ενός δυνητικού οξειδωτικού και αντιμικροβιακού παράγοντα (Babior, 2000).

Έτσι, η λειτουργία των ανοσοκυττάρων επηρεάζεται έντονα από την οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία, και για τον λόγο αυτόν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν γενικά υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών συστατικών από άλλα κύτταρα. Επομένως, η παρουσία αντιοξειδωτικών σ’ αυτά τα κύτταρα είναι θεμελιώδους σημασίας τόσο για την προστασία τους από το οξειδωτικό στρες όσο και για τη διατήρηση της λειτουργίας τους (Knight, 2000).

Ωστόσο, η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να διαταραχθεί σε διάφορες καταστάσεις, και να οδηγήσει σε μειωμένη ανοσο-απόκριση και υπερπαραγωγή ROS, κάτι που μπορεί να προληφθεί ή βελτιωθεί με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών. Η πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της τροφής ή με συμπληρώματα διατροφής τόσο στον άνθρωπο όσο και στα κατοικίδια θηλαστικά μπορεί να ενισχύσει την ανοσο-απόκριση, με την αύξηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 2, του συνολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων και ειδικότερα των Τ-λεμφοκυττάρων, της δραστηριότητας των φονικών κυττάρων, της απόκρισης των αντισωμάτων σε αντιγόνα και με τη μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και της σύνθεσης προσταγλανδινών (Knight, 2000).

Διάφορες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία εμπλέκονται στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Πίνακας 1). Η βιταμίνη Ε, εκτός από σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα που προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων λόγω αυξημένων ROS, αποτελεί σημαντικό ανοσο-ενισχυτικό παράγοντα, με κυριότερη δράση την ενίσχυση της λειτουργίας των ουδετερόφιλων. Το σελήνιο αποτελεί, επίσης, έναν σημαντικό αντιοξειδωτικό και ανοσο-ενισχυτικό παράγοντα, συμμετέχοντας στην κυτταρική ανοσία. Το σελήνιο είναι λειτουργικό στοιχείο των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, αφού αποτελεί απαραίτητο συστατικό της οικογένειας των ενζύμων ‘υπεροξειδάση της γλουταθειόνης’ (GSHPx). Τα ένζυμα αυτά καταστρέφουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα υπεροξείδια των λιπιδίων. Η αναγωγάση της θειορεδοξίνης αποτελεί ακόμη ένα ένζυμο που φέρει σελήνιο και συμβάλλει στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες (Spears and Weiss, 2008).

1.6. Οξειδωτικό στρες και εγκυμοσύνη

Η εγκυμοσύνη αποτελεί μια φυσιολογική κατάσταση του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών θηλαστικών που χαρακτηρίζεται από δραματική αύξηση των ενεργειακών απαιτήσεων του θηλυκού ζώου, ώστε να διασφαλιστεί η κανονική ανάπτυξη του/ων εμβρύου/ων. Έτσι, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τόσο ο μητρικός όσο και ο εμβρυϊκός οργανισμός εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Garrel et al., 2010).

Στα πρόβατα, 7-11 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία συντελείται η εκκόλαψη της βλαστοκύστης από τη διαφανή ζώνη και έτσι απελευθερώνεται η βλαστοκύστη που κινείται ελεύθερα στην κοιλότητα της μήτρας. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από αύξηση της παραγωγής ROS και ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH. Καθώς αναπτύσσεται το κύημα διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της ρύθμισης, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS κατά την εμβρυογένεση. Στην αγελάδα, εμφανίζεται μια σταθερή αύξηση της παραγωγής ROS, ιδιαίτερα του NO από τη γονιμοποίηση έως την 90η–120η ημέρα της εγκυμοσύνης. Αυτό έχει παρατηρηθεί και στο μυομήτριο της εγκύου προβατίνας, μέχρι την 140η ημέρα της κύησης. Αυτή η αύξηση των ROS προάγει την απόπτωση των κυττάρων στη βλαστοκύστη.

Ένας άλλος παράγοντας που εμπλέκεται στη δημιουργία ROS είναι η μερική πίεση οξυγόνου του αίματος (pO2). Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της παραγωγής ROS, που αναπτύσσεται παρουσία υψηλής pO2, επιβραδύνει τη σύνθεση του ATP, γεγονός που μπορεί να επιβραδύνει ή να βλάψει την ανάπτυξη ή ακόμα και την επιβίωση του εμβρύου. Πριν από την εγκατάσταση του εμβρύου στη μήτρα, η μερική πίεση του οξυγόνου της μήτρας (pO_2) κυμαίνεται μεταξύ 20 και 37 mmHg, ανεξάρτητα από το είδος ζώου. Παρόλα αυτά, *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι η εμβρυϊκή pO_2 ενδοκυτταρικά είναι 5-10 φορές χαμηλότερη από ό,τι εξωκυτταρικά. Έτσι, η παραγωγή ROS ενδοκυτταρικά αναμένεται επίσης να είναι χαμηλότερη από ό,τι εξωκυτταρικά.

Η παρουσία ROS στη μήτρα και στο έμβρυο κατά το πρώτο στάδιο της εγκυμοσύνης είναι απαραίτητη για τη λέπτυνση των κυτταρικών μεμβρανών του πλακούντα και την ενίσχυση της εγκατάστασης του γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα, μέσω της δημιουργίας ενός δικτύου τριχοειδών αγγείων με αυξημένη διαπερατότητα, γεγονός σημαντικό για τη διέλευση των θρεπτικών ουσιών διαμέσου του πλακούντα στο έμβρυο και για την ενίσχυση της μικροβιοκτόνου δραστηριότητας των μακροφάγων. Τα μακροφάγα, εκτός του ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση του εμβρύου, προστατεύουν το έμβρυο μέσω της παραγωγής O_2^- προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη παραγωγή ROS , θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρώιμο εμβρυικό θάνατο και απορρόφηση του εμβρύου, σε αυτό το στάδιο της εγκυμοσύνης.

Καθώς η εγκυμοσύνη εξελίσσεται, ο μεταβολισμός αυξάνεται για τη σύνθεση υψηλών ποσοτήτων ATP και την ενίσχυση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, που οδηγεί σε υπερπαραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια του πλακούντα και του εμβρύου. Οι ενζυμικές αντιδράσεις που προκαλούνται από το κυτόχρωμα P450 και από το μιτοχονδριακό αναπνευστικό σύστημα συμβάλλουν, επίσης, στη δημιουργία ROS. Αυτό υποδηλώνει ότι οι ROS μπορεί να είναι υποπροϊόν της στεροειδογένεσης. Μάλιστα, η αύξηση της προγεστερόνης του πλακούντα (P_4) συνοδεύεται από αύξηση των λιπιδίων στην κυκλοφορία του αίματος μετά την 60ή ημέρα της εγκυμοσύνης, καθώς και της μηλονδιαλδεΰδης (MDA), η οποία είναι δείκτης οξειδωτικού στρες. Η παραγωγή MDA, που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της στεροειδογένεσης, αυξάνεται σημαντικά μέχρι την 21η ημέρα της εγκυμοσύνης και συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι την 120η ημέρα. Υψηλές συγκεντρώσεις MDA έχουν ανευρεθεί σε πλακούντια, κάτι που ενισχύει την υπόθεση ότι η εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από οξειδωτικό στρες, λόγω του αυξημένου μεταβολισμού και της στεροειδογένεσης στον πλακούντα .

Ωστόσο, τόσο το έμβρυο όσο και ο πλακούντας διαθέτουν ένα σύνθετο αντιοξειδωτικό σύστημα απαραίτητο για την πρόληψη των βλαβερών επιπτώσεων των υψηλών επιπέδων ROS. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων ενισχύεται, όπως της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της υπεροξειδικής δισμουτάσης του μαγγανίου (MnSOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και, ιδιαίτερα, της γλουταθειόνης (GSH). Η γλουταθειόνη συμβάλλει στη διατήρηση της ζωτικότητας του εμβρύου, μέσω της αναστολής της υπεροξείδωσης των λιπιδίων των προ-αποπτωτικών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και τον έλεγχο του ενδοκυττάριου δυναμικού οξειδοαναγωγής.Στις προβατίνες έχει παρατηρηθείι αύξηση τόσο της GPx όσο και της GSH και ταυτόχρονη μείωση της δραστικότητας της MnSOD, μεταξύ της 35ης και της 55ης ημέρας της εγκυμοσύνης. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, όπου ασκεί κεντρικό ρόλο στην άμυνα του εμβρύου/πλακούντα έναντι των ROS, ιδιαίτερα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι τους πρώτους μήνες της εγκυμοσύνης, τα πλακούντια υφίστανται αναδιάταξη που προάγεται από πολλαπλασιαστικά και αποπτωτικά γεγονότα. Η απόπτωση ελέγχεται από την έκφραση ενός αριθμού ρυθμιστικών γονιδίων, τόσο προ-αποπτωτικών (BAX) όσο και αντι-αποπτωτικών (MCL1), που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2. Σε αυτό το πλαίσιο, η έκφραση του γονιδίου BAX ενισχύεται από τα ROS, ενώ η έκφραση του γονιδίου MCL1 επάγεται από την GPx. Έτσι, η προστασία από την απόπτωση σχετίζεται με τη μείωση της αναλογίας BAX/MCL1, η οποία συμβαίνει ως επί το πλείστον κατά το πρώτο ήμισυ της εγκυμοσύνης (από την 35η έως την 80η ημέρα) και οφείλεται σε ρύθμιση του προ-αποπτωτικού γονιδίου BAX που προάγεται από την αύξηση της GPx. Αυτή η αύξηση ασκεί προστατευτική δράση στα πλακούντια και εξισορροπεί την οξειδωτική δράση του H_2O_2, συμβάλλοντας έτσι στη σύνθεση της προγεστερόνης, που είναι απαραίτητη για την επιτυχή εξέλιξη της εγκυμοσύνης.

Εκτός από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, διάφορες βιταμίνες εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και στην επακόλουθη δημιουργία ROS. Οποιαδήποτε ανεπάρκεια ή περίσσεια βιταμινών που εμπλέκεται σε μια τέτοια ρύθμιση μπορεί εξίσου να οδηγήσει σε πιο έντονη παραγωγή ROS, και τελικά σε απόπτωση που οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο. Αύξηση των ROS έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις ανεπάρκειας της βιταμίνης A, C ή E, επειδή αυτές οι βιταμίνες, εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση, μπορεί να ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση και τον μεταβολισμό, που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Έτσι, καθώς η εγκυμοσύνη εξελίσσεται, η μεταφορά από τον πλακούντα της βιταμίνης A, C, E, καθώς και ορισμένων βιταμινών της ομάδας B και μετάλλων αυξάνεται, για να εξισορροπηθούν τα δυσμενή αποτελέσματα των ROS (Mutinati et al., 2013).

Η περιγεννητική (περιτοκιαία ή μεταβατική περίοδος), που ξεκινά 3 εβδομάδες πριν τον τοκετό και διαρκεί έως την τρίτη εβδομάδα μετά τον τοκετό, αποτελεί μια ιδιαίτερα στρεσογόνο περίοδο για τις προβατίνες. Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανοσο-απόκριση λόγω της αυξανόμενης παραγωγής κορτικοστεροειδών και από αυξημένη παραγωγή ROS λόγω των υψηλότερων μεταβολικών απαιτήσεων που συνδέονται με την ταχύτατη ανάπτυξη του εμβρύου κατά τον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης, την έναρξη και ολοκλήρωση του τοκετού, τη γαλακτογένεση και τη γαλακτοπαραγωγή (Spears and Weiss, 2008). Ειδικότερα, κατά τον τοκετό η κατανάλωση O_2 τριπλασιάζεται και συντελείται πραγματική ‘οξειδωτική έκρηξη’, οδηγώντας σε υπερπαραγωγή ROS, κυρίως O_2^- και H_2O_2. Συγκεκριμένα στις έγκυες προβατίνες, ιδιαίτερη αύξηση των ROS σημειώνεται για το χρονικό διάστημα μεταξύ 36 ωρών πριν και 36 ωρών μετά τον τοκετό. Κατά τον τοκετό, που στην πραγματικότητα συνιστά μία οξεία φλεγμονώδη διαδικασία, η μήτρα και ο τράχηλος κατακλύζονται από φλεγμονώδη κύτταρα, ειδικότερα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στη συσπαστικότητα του μυομητρίου μέσω της παραγωγής διαφόρων μορίων όπως είναι οι προσταγλανδίνες, η σεροτονίνη και το αγγειοκινητικό πεπτίδιο. Ο αυξημένος αριθμός των λευκοκυττάρων αυξάνει την παραγωγή ROS, οι οποίες με τη σειρά τους ενισχύουν την οξεία φλεγμονώδη διαδικασία με την ενεργοποίηση κάποιων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NF-kB. Επιπρόσθετα, λίγο πριν τον τοκετό, η αύξηση της παραγωγής οιστρογόνων και η μείωση της παραγωγής προγεστερόνης ενισχύει τη φλεγμονώδη διεργασία και τις μεταβολικές ανάγκες, οδηγώντας σε επιπλέον παραγωγή ROS. Επίσης, η αυξημένη παραγωγή ROS συνδέεται με αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως διαπιστώθηκε στο ομφαλικό αίμα. Επομένως, οι ROS διαδραματίζουν ουσιαστικό λειτουργικό ρόλο στη διαδικασία του τοκετού επειδή ρυθμίζουν άμεσα και έμμεσα την παραγωγή προσταγλανδινών, ορμονών που είναι απαραίτητες για τη συσπαστικότητα του μυομητρίου, καθώς και την ωρίμανση και διαστολή του τραχήλου (Mutinati et al., 2013).

Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κατάλληλη οξειδοαναγωγική κατάσταση, πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη βέλτιστη ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα, την εγκατάσταση του εμβρύου, τη φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη, την αποφυγή εμβρυικού θανάτου, τον φυσιολογικό τοκετό και τη γέννηση υγιών απογόνων.

1.7 Πρόβατα φυλής Lacaune

Το κατοικίδιο πρόβατο (*Ovis aries*) είναι ένα μηρυκαστικό θηλαστικό ζώο, που ανήκει στην τάξη Αρτιοδάκτυλα (*Artiodactyla*) των οπληφόρων θηλαστικών. Πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας (Hatziminaoglou and Boyazoglu, 2004; Zeder and Hesse, 2000). Η εξημέρωση των άγριων προβάτων ξεκίνησε στη Μεσοποταμία (Ιράν) και χρονολογείται περίπου στο 10 αιώνα π.Χ. Στη συνέχεια η προβατοτροφία αναπτύχθηκε και εξαπλώθηκε σε όλον τον κόσμο, δημιουργήθηκαν εκατοντάδες διαφορετικές φυλές στο πέρασμα των αιώνων, ενώ στη σύγχρονη εποχή υπολογίζεται ότι εκτρέφονται περισσότερα από 1 δισεκατομμύριο πρόβατα (Haenlein, 2007; Rannamäe et al., 2016).

Η φυλή Lacaune αποτελεί την κύρια φυλή γαλακτοπαραγωγικών προβάτων της Γαλλίας, που δημιουργήθηκε από διασταυρώσεις γεννητόρων των φυλών Lauraguais, Larzac, Montagne, Merinos και Southdown. Αρχικά ήταν φυλή διπλής παραγωγικής κατεύθυνσης (γαλακτοπαραγωγικής και κρεοπαραγωγικής), ενώ στην πορεία βελτιώθηκε για καθένα από αυτά τα παραγωγικά χαρακτηριστικά ξεχωριστά. Η φυλή εισάχθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 1993 (Ζυγογιάννης, 2006). Τα τελευταία χρόνια έχει εξελιχθεί σε φυλή με υψηλή γαλακτοπαραγωγική απόδοση και βελτιωμένη σύσταση γάλακτος. Όμως, διατηρεί την ικανότητα κρεοπαραγωγής της και τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης των αμνών (Barillet et al. 2001).

Τα πρόβατα της φυλής Lacaune είναι μεγαλόσωμα, λευκού χρωματισμού, δίχως κέρατα και στα δύο φύλα. Η διάπλαση του σώματός τους είναι χαρακτηριστική των προβάτων του γαλακτοπαραγωγικού τύπου. Η εριοκάλυψη περιορίζεται στη ραχιαία επιφάνεια του σώματος, ενώ σε μερικά ζώα απουσιάζει πλήρως στα άκρα και στην κοιλιακή χώρα. Το κεφάλι είναι μακρύ, λεπτό και με ελαφρώς κυρτό επιρρίνιο. Η ουρά είναι λεπτή και πολύ μακριά, που μπορεί να φθάνει έως την κορυφή της πτέρνας. Το βάρος των προβατίνων αγγίζει τα 75kg και το ύψος ακρωμίου τα 70 cm, ενώ των κριών τα 100 kg και τα 75 cm, αντίστοιχα. Το βάρος γέννησης των αμνών είναι περίπου 4,5 kg για τους αρσενικούς και 4,0 kg για τους θηλυκούς, ενώ το βάρος κατά τον απογαλακτισμό σε ηλικία 28 ημερών είναι 13 kg και 12kg, αντίστοιχα. Ο δείκτης πολυδυμίας είναι 1,3-1,5 και η φυλή παρουσιάζει πρώιμη γενετήσια ωριμότητα, με τα αρσενικά και τα θηλυκά να ενηβώνονται σε ηλικία 7 και 8 μηνών, αντίστοιχα. Το ποσοστό γονιμότητας αγγίζει 90-92%, εκτός από τις προβατίνες μεγάλης ηλικίας που η γονιμότητα μειώνεται. Στις εντατικές εκτροφές μπορούν να επιτευχθούν 3 τοκετοί ανά 2 χρόνια. Στις περισσότερες εκτροφές η μέση γαλακτοπαραγωγή είναι 350 kg γάλα σε διάρκεια γαλακτικής περιόδου 210 μέρες. Ο μέσος όρος της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος είναι 7,2%, σε πρωτεΐνη 5,4% και σε λακτόζη 4,3%. Η κρεοπαραγωγική ικανότητα της φυλής είναι εξαιρετική. Η μέση ημερήσια αύξηση βάρους των παχυνόμενων αρνιών μπορεί να φτάσει τα 320 γραμμάρια/ημέρα. Η απόδοση σε σφάγιο κυμαίνεται συνήθως στο 55-65% του ζώντος βάρους (Ρογδάκης, 2006).

1.8 Κλωστριδιακές λοιμώξεις-εμβολιασμοί

Οι κλωστριδιακές λοιμώξεις προκαλούνται από είδη του γένους *Clostridium*, που είναι Gram θετικά, αναερόβια και σπορογόνα βακτήρια. Αποτελούν σαπρόφυτα του εδάφους και του εντερικού σωλήνα των ζώων και του ανθρώπου, ενώ κάποια είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Τα εντεροπαθογόνα βακτήρια, όπως το *Clostridium perfringens*, παράγουν αρκετούς λοιμογόνους παράγοντες που περιλαμβάνουν συγκολλητίνες και εντεροτοξίνες, οι οποίες αυξάνουν τον αποικισμό του βλεννογόνου και προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις. Οι τοξίνες του *C. perfringens* ταξινομούνται σε -α, -β, -ε και -ι, ενώ το *C perfringens*, με βάση την παραγωγή των κύριων τοξινών του ταξινομείται σε πέντε τοξινικούς τύπους: A, B, C, D και E (Fernandez-Miyakawa & Redondo, 2018). Τα *Clostridium perfringens* τύπου C, D και E αποτελούν σημαντικά παθογόνα βακτήρια για τα μικρά μηρυκαστικά, καθώς προκαλούν εντεροτοξιναιμίες, νοσήματα που εκδηλώνονται, κυρίως, με συμπτώματα στο πεπτικό σύστημα και αιφνίδιους θανάτους ενώ συχνά συνοδεύονται από νευρολογικές διαταραχές (Pugh & Baird, 2011). Διακρίνονται σε *εντεροτοξιναιμία των νεαρών ή δυσεντερία*, που προσβάλλει νεαρούς αμνούς και ερίφια έως την ηλικία των 14 ημερών και σε *εντεροτοξιναιμία των μικρών μηρυκαστικών* που προσβάλλει ζώα ηλικίας μεγαλύτερης του ενός μηνός.

Συγκεκριμένα, η α-τοξίνη που παράγεται από το *C. perfringens* τύπου C και D, προκαλεί κλινικές και εργαστηριακές εκδηλώσεις, όπως ληθαργικότητα, αναιμία, ίκτερο και αιμοσφαιρινουρία και κατάληξη το θάνατο μετά από 6-12 ώρες. Ευρήματα από νεκροψίες περιλαμβάνουν ωχρό και εύθρυπτο ήπαρ και σπλήνα και παρουσία ερυθρών ούρων στην ουροδόχο κύστη. Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν νέκρωση του ήπατος, συμφόρηση του σπλήνα, νεφρίτιδα και οίδημα (Fernandez-Miyakawa & Redondo, 2018). Η τοξίνη -β παράγεται από τα στελέχη *C. perfringens* τύπου B και C και είναι ο βασικός παράγοντας λοιμογόνου δράσης που εμπλέκεται στην αιμορραγική εντερίτιδα τύπου C. Τα στελέχη τύπου C προκαλούν θανατηφόρες λοιμώξεις που κυμαίνονται από νεκροαιμορραγική εντεροκολίτιδα έως εντεροτοξιναιμία σε πρόβατα, αίγες, χοίρους, άλογα και βοοειδή. Παρόλο που και τα ενήλικα ζώα μπορούν να προσβληθούν, τα νεαρά ζώα είναι πιο ευάλωτα. Σε εκτροφές που δεν εφαρμόζονται εμβολιασμοί κατά αυτών των στελεχών, η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει το 100%, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες (Fernandez-Miyakawa & Redondo, 2018).

Η τοξίνη -ε παράγεται από στελέχη τύπου D και είναι υπεύθυνη για τη θανατηφόρα εντεροτοξιναιμία στα ζώα. Προκαλεί ρήξη των κυτταρικών δεσμών στο ενδοθήλιο των αγγείων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οιδημάτων σε διάφορα όργανα, όπως στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες και στους νεφρούς (Watson &Scholes, 2009).Τα στελέχη τύπου D προκαλούν οξείες, υποξείες ή χρόνιες ασθένειες στα πρόβατα, που χαρακτηρίζονται από αιφνίδιο θάνατο ή νευρολογικά και αναπνευστικά συμπτώματα, όπως τύφλωση, σπασμοί και αφρός από το στόμα πριν από τον θάνατο. Περιστασιακά παρατηρούνται κλινικές εκδηλώσεις του πεπτικού συστήματος, όπως διάρροια, αν και δεν αποτελεί συχνή κλινική εικόνα στα πρόβατα (Fernandez-Miyakawa & Redondo, 2018).

Σε διεθνές επίπεδο, διάφορα μονοσθενή εμβόλια έναντι των κλωστριδίων είναι εγκεκριμένα για χρήση σε πρόβατα, ωστόσο η χρήση πολυδύναμων εμβολίων είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη σε όλον τον κόσμο (Lewis, 2011). Τα προγράμματα εμβολιασμού πρέπει να σχεδιάζονται για την προστασία των ενήλικων ζώων, καθώς και για την παθητική ανοσοποίηση των νεογνών. Η προστασία των ενήλικων προβάτων με ενεργητική ανοσοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με τη χορήγηση δύο δόσεων του εμβολίου με διαφορά τεσσάρων έως έξι εβδομάδων (Lewis, 2011) ή ακόμη και με διαφορά οκτώ εβδομάδων. Η μέγιστη συγκέντρωση των αντισωμάτων επιτυγχάνεται 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Lacasta et al., 2015).

Ο εμβολιασμός των εγκύων προβατίνων κατά των κλωστριδίων αποτελεί πρακτική προληπτικής διαχείρισης, δεδομένου ότι οι αμνοί γεννιούνται δίχως παθητική ανοσία, οπότε οι νεογέννητοι αμνοί μπορούν να προστατευθούν μόνο μέσω της απορρόφησης αντισωμάτων που προσλαμβάνονται με το πρωτόγαλα. Οι έγκυες προβατίνες πρέπει να εμβολιάζονται τέσσερις έως τρεις εβδομάδες πριν από την αναμενόμενη ημερομηνία έναρξης της περιόδου τοκετών, με σκοπό την επίτευξη μέγιστων συγκεντρώσεων αντισωμάτων στο πρωτόγαλα για την παθητική ανοσοποίηση των νεογνών (Lewis, 2011).

Οι αμνοί που γεννιούνται από μη εμβολιασμένες προβατίνες δεν προσλαμβάνουν με το πρωτόγαλα τις ειδικές ανοσοσφαιρίνες, επομένως ο εμβολιασμός τους θα πρέπει να γίνεται κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννησή τους. Αντίθετα, οι αμνοί που γεννιούνται από εμβολιασμένες προβατίνες προσλαμβάνουν τα ειδικά αντισώματα μέσω του πρωτογάλακτος, οπότε ο εμβολιασμός τους δεν πρέπει ποτέ να γίνεται πριν από την ηλικία των τεσσάρων έως έξι εβδομάδων και ιδανικά πραγματοποιείται μετά την ηλικία των έξι έως οκτώ εβδομάδων (Lacasta et al., 2015).

Οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων μειώνονται σε μια περίοδο 10-12 μηνών. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητοι τουλάχιστον ετήσιοι ενισχυτικοί εμβολιασμοί στις εκτροφές προβάτων. Το ετήσιο πρόγραμμα εμβολιασμών εφαρμόζεται στις εκτροφές που προγραμματίζεται ένας τοκετός ανά προβατίνα τον χρόνο, δηλαδή στην πλειονότητα των εκμεταλλεύσεων με εκτατική, ημιεκτατική ή ημιεντατική διαχείριση. Ωστόσο, εάν προγραμματιστούν πολλές περίοδοι τοκετών εντός ενός έτους, όπως σε εκμεταλλεύσεις με εντατική διαχείριση, πρέπει να προγραμματιστούν εμβολιασμοί σε έγκυες προβατίνες στο τελευταίο στάδιο της εγκυμοσύνης τους, όπως περιγράφεται παραπάνω. Σε αυτές τις περιπτώσεις, δεν χρειάζεται να γίνει εμβολιασμός ολόκληρου του κοπαδιού (Lacasta et al., 2015).

Επίσης, το πρόγραμμα εμβολιασμού μπορεί να τροποποιηθεί σύμφωνα με το σύστημα διαχείρισης που εφαρμόζεται σε κάθε εκτροφή, με πιθανή εισαγωγή μικρότερων διαστημάτων μεταξύ των εμβολιασμών, εάν επικρατούν παράγοντες κινδύνου σε άλλα χρονικά σημεία του ετήσιου κύκλου παραγωγής. Επομένως, εάν η πιθανότητα νόσησης θεωρείται υψηλή, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αναμνηστικού εμβολιασμού κάθε έξι μήνες. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες, όπου οι παράγοντες κινδύνου αυξάνονται την άνοιξη και το φθινόπωρο σε εκτροφές εκτατικού ή ημι-εκτατικού συστήματος διαχείρισης, γι' αυτό συνιστάται να εμβολιάζονται σε αυτές τις περιόδους, πριν εισέλθουν στα νέα βοσκοτόπια (Lacasta et al., 2015).

Το πολυδύναμο εμβόλιο παρέχει ενεργητική ανοσοποίηση έναντι των παθογόνων *C. perfringens* τύπου A, B, C και D, *Clostridium sordellii, C. novyi* τύπου B, *septicum, tetani* και *chauvoei*. Αυτά τα παθογόνα ή οι τοξίνες τους προκαλούν τις ασθένειες που αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Παθογόνα στελέχη *Clostridium perfringens* και ασθένειες που προκαλούν (Panclostil, 2010)

Παθογόνα	**Ασθένειες**
α-τοξίνη του ***Clostridium perfringens*** τύπου A	Εντεροτοξιναιμία
β-τοξίνη του ***Clostridium perfringens*** τύπου B και C	Δυσεντερία, αιμορραγική εντερίτιδα και λοιμώδης εντεροτοξιναιμία
ε-τοξίνη του ***Clostridium perfringens*** τύπου D	Νεφροπάθεια
τοξίνη του ***Clostridium septicum***	Bradsot

τοξίνη του ***Clostridium novyi*** τύπου Β	Νεκρωτική ηπατίτιδα
τοξίνη του ***Clostridium tetani***	Τέτανος
τοξίνη του ***Clostridium chauvoei***	Πνευματάνθρακας
τοξίνη του ***Clostridium sordellii***	Εντεροτοξιναιμία στα πρόβατα

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να προσδιοριστεί η επίδραση της χορήγησης της ετήσιας αναμνηστικής δόσης πολυδύναμου εμβολίου για την πρόληψη κλωστριδιακών λοιμώξεων σε έγκυες προβατίνες με ή χωρίς ταυτόχρονη χορήγηση βιταμίνης Ε και σεληνίου (Vit E/Se), στους δείκτες οξειδωαναγωγικής κατάστασης (ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δραστικότητα καταλάσης (CAT), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)). Στη μελέτη εντάχθηκαν 24 προβατίνες φυλής Lacaune, ηλικίας 2 έως 4 χρονών, στον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης. Οι προβατίνες χωρίστηκαν σε τέσσερις ισάριθμες ομάδες: στην ομάδα V, στην οποία πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός έναντι κλωστριδιακών λοιμώξεων, στην ομάδα VE, που έγινε εμβολιασμός έναντι κλωστριδιακών λοιμώξεων και χορήγηση βιταμίνης E/Se, στην ομάδα E, που έγινε μόνο έγχυση βιταμίνης E/Se και στην ομάδα C, που περιλάμβανε τα ζώα μάρτυρες. Η περίοδος μελέτης διήρκεσε 21 ημέρες, ξεκινώντας την ημέρα των χορηγήσεων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

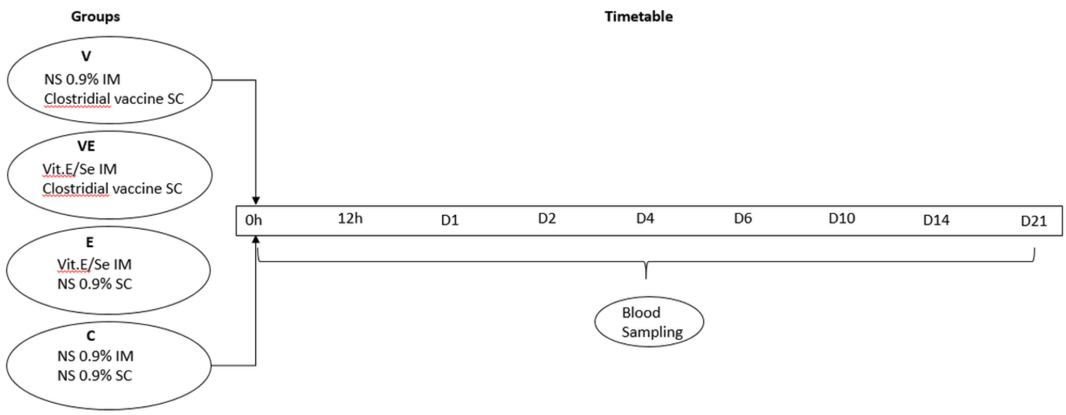
3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 24 προβατίνες, 2 έως 4 χρονών, φυλής Lacaune, 3-4 εβδομάδες πριν τον αναμενόμενο χρόνο τοκετών. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο εμβολιασμού κατά των κλωστριδιακών λοιμώξεων, σ’ όλα τα ζώα αντικατάστασης χορηγήθηκε η πρώτη δόση εμβολίου στην ηλικία των 2 μηνών, η δεύτερη 3-4 εβδομάδες αργότερα και στη συνέχεια μια ετήσια αναμνηστική δόση περίπου ένα μήνα πριν από την αναμενόμενη ημέρα τοκετού. Για τον συγχρονισμό των τοκετών, στις προβατίνες εφαρμόσθηκε ορμονική αγωγή με σπόγγους προγεσταγόνων (οξική φλουγεστόνη 20 mg, Chronogest®, Intervet, Boxmeer, Ολλανδία), οι οποίοι τοποθετήθηκαν ενδοκολπικά και παρέμειναν *in situ* για 14 ημέρες. Κατά την αφαίρεση των σπόγγων χορηγήθηκε ενδομυϊκά ίππεια χοριακή γοναδοτροπίνη (δόση eCG: 300 IU, Gonaser®, Laboratorios Hipra, Girona, Ισπανία). Η διάγνωση της εγκυμοσύνης έγινε με υπερηχογραφική εξέταση (U/S) 50 ημέρες μετά την αφαίρεση των σπόγγων. Η υπερηχογραφική εξέταση επαναλήφθηκε πριν από την έναρξη του πειραματισμού, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διατήρηση της εγκυμοσύνης και η παρουσία ζωντανών εμβρύων. Χορηγήθηκε ανθελμινθική αγωγή (10 mg/kg ΣΒ *per os*, oral suspension Albendazole 10%, Provet, Ελλάδα) ένα μήνα πριν από την έναρξη της μελέτης και δεν χορηγήθηκε άλλο εμβόλιο ή θεραπεία για τουλάχιστον 6 μήνες.

Οι προβατίνες χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ισάριθμες ομάδες: στην ομάδα V (n=6) που χορηγήθηκε υποδόρια η ετήσια αναμνηστική δόση ενός πολυδύναμου εμβολίου κατά των κλωστριδιακών λοιμώξεων (δόση: 2 ml SC, Panclostil, Ceva Hellas S.A.), στην ομάδα VE (n=6) που χορηγήθηκε το πολυδύναμο εμβόλιο και ένα διάλυμα βιταμίνης E και Se ενδομυϊκά (δόση βιταμίνης E/Se: 30 IU/kg Σ.Β., Vitamin E-Selen, MSD Animal Health, Hellas), στην ομάδα E (n=6) που χορηγήθηκε ενδομυϊκά μόνο βιταμίνη E/Se και στην ομάδα C (n=6) που δεν χορηγήθηκε ούτε εμβόλιο ούτε βιταμίνη E/Se και αποτέλεσαν τα ζώα μάρτυρες της μελέτης. Η δόση της βιταμίνης E που χορηγήθηκε βασίστηκε σε πρωτόκολλο που είχε δοκιμαστεί προηγουμένως (Anugu et al., 2013). Επιπλέον, στις προβατίνες της ομάδας V χορηγήθηκε ενδομυικά ως εικονικό φάρμακο (*placebo*) ίσος όγκος φυσιολογικού ορού (NS 0,9%) με τον όγκο της βιταμίνης E/Se. Στις προβατίνες της ομάδας E χορηγήθηκε υποδόρια ως εικονικό φάρμακο ίσος όγκος φυσιολογικού ορού (NS 0,9%) με τον όγκο του εμβολίου. Στους μάρτυρες (ομάδα C) χορηγήθηκε ενδομυικά και υποδόρια ως εικονικό φάρμακο ίσος όγκος φυσιολογικού ορού (NS 0,9%) με τον όγκο της βιταμίνης E/Se και του εμβολίου, αντίστοιχα.

Η περίοδος της μελέτης ξεκίνησε την ημέρα της χορήγησης του εμβολίου και βιταμίνης E/Se (ημέρα 0) και διήρκεσε έως την 21η ημέρα (Εικόνα 2). Κατά τη διάρκεια της μελέτης τα ζώα παρέμειναν σταβλισμένα και διατρέφονταν με το ίδιο σιτηρέσιο, που προσφερόταν 2 φορές την ημέρα (ανά προβατίνα: 0, 5kg μίγματος συμπυκνωμένης ζωοτροφής για προβατίνες ξηράς περιόδου και 1,2 kg σανού μηδικής). Επίσης, άχυρο κριθαριού χορηγούνταν τρεις φορές την ημέρα, ενώ το νερό ήταν διαθέσιμο κατά βούληση. Στο μίγμα συμπυκνωμένης ζωοτροφής περιέχονταν σελήνιο και βιταμίνη E σε συγκέντρωση 0,25 mg/kg και 40 mg/kg μίγματος, αντίστοιχα, ως πρακτική διαχείρισης της διατροφής, σύμφωνα με τους NRC (2007) και Dønnem et al (2015).

Πραγματοποιήθηκε κλινική παρακολούθηση των ζώων για την ανίχνευση τυχόν γενικών ή τοπικών ανεπιθύμητων ενεργειών στα σημεία των εγχύσεων. Κατά τη διάρκεια των 4 ημερών μετά τον εμβολιασμό, η θερμοκρασία του απευθυσμένου των ζώων μετρούνταν καθημερινά.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου

3.2 Αιμοληψίες

Η συλλογή δειγμάτων αίματος έγινε από τη σφαγίτιδα φλέβα σε φιαλίδια κενού (10ml) που περιείχαν την αντιπηκτική ουσία EDTA. Αιμοληψία έγινε από όλες τις προβατίνες αμέσως πριν από τις χορηγήσεις (0h) κι έπειτα στις 12 (12h), 24 (D1) και 48 ώρες (D2), και στη συνέχεια 4 (D4), 6 (D6), 10 (D10), 14 (D14) και 21 ημέρες (D21) μετά τις χορηγήσεις.

3.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωαναγωγικής κατάστασης

3.3.1 Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης (CAT). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας προσδιορίστηκε επίσης η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ενός δείκτη που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Χρησιμοποιήθηκαν:

- Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης.
- Πλάσμα για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των TBARS.

Συλλογή πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

1. Φυγοκέντρηση δειγμάτων αίματος στις 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 ^{o}C.
2. Συλλογή του πλάσματος του αίματος και αποθήκευσή του σε φιαλίδια eppendorf.
3. Προσθήκη απιονισμένου νερού (dH_2O) (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του φιαλιδίου αιμοληψίας.
4. Έντονη ανάδευση.
5. Φυγοκέντρηση στις 4000 g, για 15 λεπτά, στους 4 ^{o}C.
6. Συλλογή του υπερκείμενου υγρού, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (red blood cell lysate-RBCL). Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων σχηματίζουν ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL). Αποθήκευση του RBCL σε eppendorf στους -80 ^{o}C.

Καθαρισμός αιμολύματος για την προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης

1. Προσθήκη 500 μL αιμολύματος σε 500 μL 5% TCA σε eppendorf.

2. Ανάδευση στο vortex.

3. Φυγοκέντρηση στις 22000 g για 5 min στους 5 ^oC.

4. Συλλογή του υπερκειμένου υγρού σε eppendorf και προσθήκη 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA.

5. Ανάδευση στο vortex.

6. Φυγοκέντρηση στις 22000 g για 5 min στους 5 ^oC.

7. Αποθήκευση του καθαρού υπερκείμενου υγρού σε eppendorf, 100 μL για την GSH στους -20 ^oC.

3.3.2 Μέθοδοι

1. Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο κοπιώδης τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο. Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH$^•$) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Πειραματική διαδικασία

Αναλυτικότερα, 20 μl πλάσματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7,4) και διάλυμα DPPH• (0,1 mM σε μεθανόλη). Ακολούθησε επώαση για 60 min στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση (16000 g, 3 min, 25oC). Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκειμένου έγινε στα 520 nm.

Στον πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σειρά και οι ποσότητες προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC

	Τυφλό	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	480 μL

DPPH 0.1 Mm	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	-
Πλάσμα	-	20 μL

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i. % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού x 100

ii. μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = [(% Abs μείωση / 100) x 50 x 25 x 3 ή 4 x 5] / 1000.

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

b. Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

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

d. Πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/5 κατά τη μέτρηση.

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

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

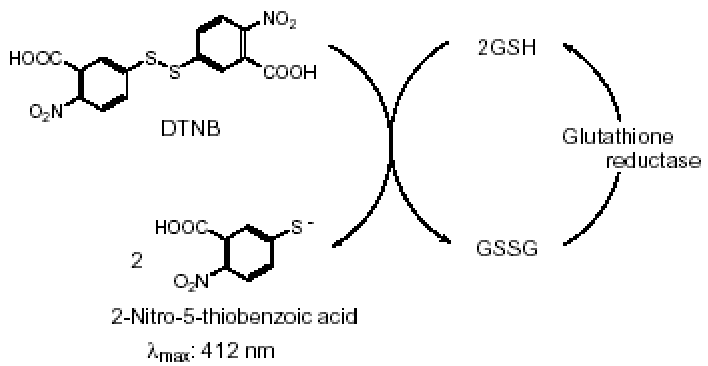
2. Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν με οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

$$2\ GSH + DTNB \rightarrow GSSG + 2\text{-nitro-5- thiobenzoic acid}$$

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



Εικόνα 3: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Πειραματική διαδικασία

20 μl πλάσματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,95) και διάλυμα DNTB (1 mM). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm.

Στον πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σειρά και οι ποσότητες προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH

	Τυφλό	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	-	20 μL

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = ($Abs_{δείγματος}$ – $ΔAbs_{τυφλού}$ / 13,6) * 262,6, όπου το 262,6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) (1010 / 20 = 50,5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 * 1,3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

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

Αρχή της μεθόδου

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

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 ^oC.

Πειραματική διαδικασία

Αναλυτικότερα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προστέθηκαν 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl, πραγματοποιήθηκε ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επώαση στους 95 ^oC για 45 min στο υδατόλουτρο και μεταφορά των δοκιμαστικών σωλήνων στον πάγο. Αφήσαμε να κρυώσουν για 5 min, προστέθηκαν 1 mL TCA 70% και πραγματοποιήθηκε ανάδευση. Τέλος μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε (11200 g, 25^oC, 3 min). Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκειμένου έγινε στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

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

4. Δραστικότητα της Καταλάσης (CAT)

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνπ. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:

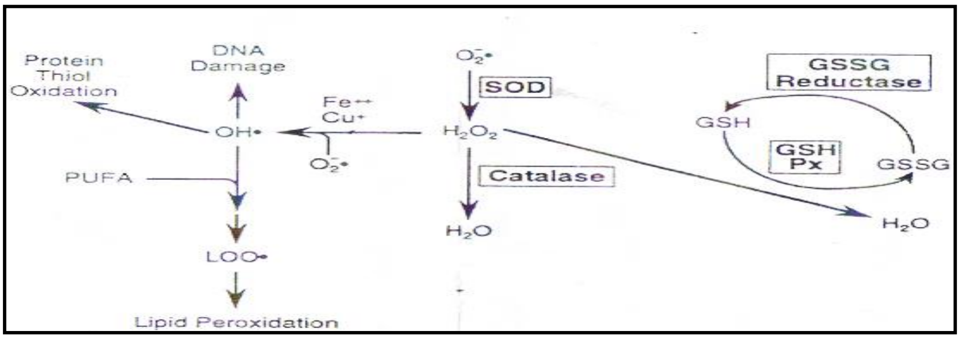
$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \rightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}E$

$H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}E \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-}E + O_2$

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



Εικόνα 4: Μονοπάτι διάσπασης του H_2O_2 σε H_2O

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

$$H_2O_2 + H_2A\ (\text{substrate}) \rightarrow 2\ H_2O + A$$

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

Πειραματική διαδικασία

Αναλυτικότερα, 4 μl πλάσματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στον κλίβανο για 10 min στους 37 °C στο σκοτάδι ενώ τέλος προσθέσαμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης πραγματοποιήθηκε στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Στον πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σειρά και οι ποσότητες προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 5: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της καταλάσης

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (ΔAbs_{sample} per min / 40) * (750 *1000 *10 *2) / Conc. Hb (mg/mL). Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων. Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως (μmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10x2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

ΔAbs (min) = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι 16 mM. Εκφράζεται σε Units = μmol/min.

5. Υπολογισμός Αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο του hemiglobincyanide (HiCN) χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία). Η αιμοσφαιρίνη οξειδώνεται από το potassium ferricyanide σε μεθαιμοσφαιρίνη η οποία μετατρέπεται σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη από το potassium cyanide. Η ένταση του χρώματος που σχηματίζεται, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στο δείγμα.

Πειραματική διαδικασία

Αναλυτικότερα, 5 μl αιμολύματος αναμίχθηκαν με το διάλυμα R1 φωσφορικών (pH 7.3, Potassium ferricyanide 0,60 mmol/L, Potassium cyanide 0,90 mmol/L, Dihydrogen potassium phosphate 2 mmol/L). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 10 min στο σκοτάδι. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης πραγματοποιήθηκε στα 540 nm.

Στον πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σειρά και οι ποσότητες προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 6: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης

	Δείγμα
R1	1000 μL
Αιμόλυμα	5 μL

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται από την εξίσωση: Hb(g/dl) = ΔA_{sample} x 29,4

3.3.3 Ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα JASP 16.1. Η κανονικότητα της κατανομής των δεδομένων αξιολογήθηκε με τη δοκιμή Shapiro-Wilk και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων αξιολογήθηκε με τη δοκιμή Levene. Εκτελέστηκε ANOVA επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για να αξιολογηθεί η επίδραση της ημέρας δειγματοληψίας (ημέρα), της θεραπείας (ομάδα) και των αλληλεπιδράσεών της ομάδας και της ημέρας στους δείκτες οξειδωαναγωγικής κατάστασης που αξιολογήθηκαν, καθώς και για τη σύγκριση των διαφορών μεταξύ των ομάδων τις ίδιες μέρες δειγματοληψίας και μεταξύ των ημερών δειγματοληψίας σε κάθε ομάδα. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμή Tukey. Τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις συγκρίσεις και τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα (SE) .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά τον εμβολιασμό δεν παρατηρήθηκε τοπικός ερεθισμός στο σημείο της χορήγησης και όλα τα ζώα παρέμειναν κλινικώς υγιή, με θερμοκρασία απευθυσμένου εντός των τιμών αναφοράς (39-40 ^{o}C), καθ' όλη την περίοδο παρατήρησης.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, η χορήγηση των εμβολίων και της βιταμίνης E/Se (ομάδα) είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), αλλά όχι στα επίπεδα ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και στην καταλάση (CAT). Ωστόσο, όλοι οι δείκτες οξειδωαναγωγικής κατάστασης που αξιολογήθηκαν επηρεάστηκαν σημαντικά από την ημέρα δειγματοληψίας και την αλληλεπίδραση 'ομάδα × ημέρα' εκτός από την καταλάση (CAT), η οποία δεν επηρεάστηκε από την 'ομάδα × ημέρα'. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση/δραστικότητα των δεικτών στο πλάσμα του αίματος κατά τη διάρκεια της μελέτης παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1–4.

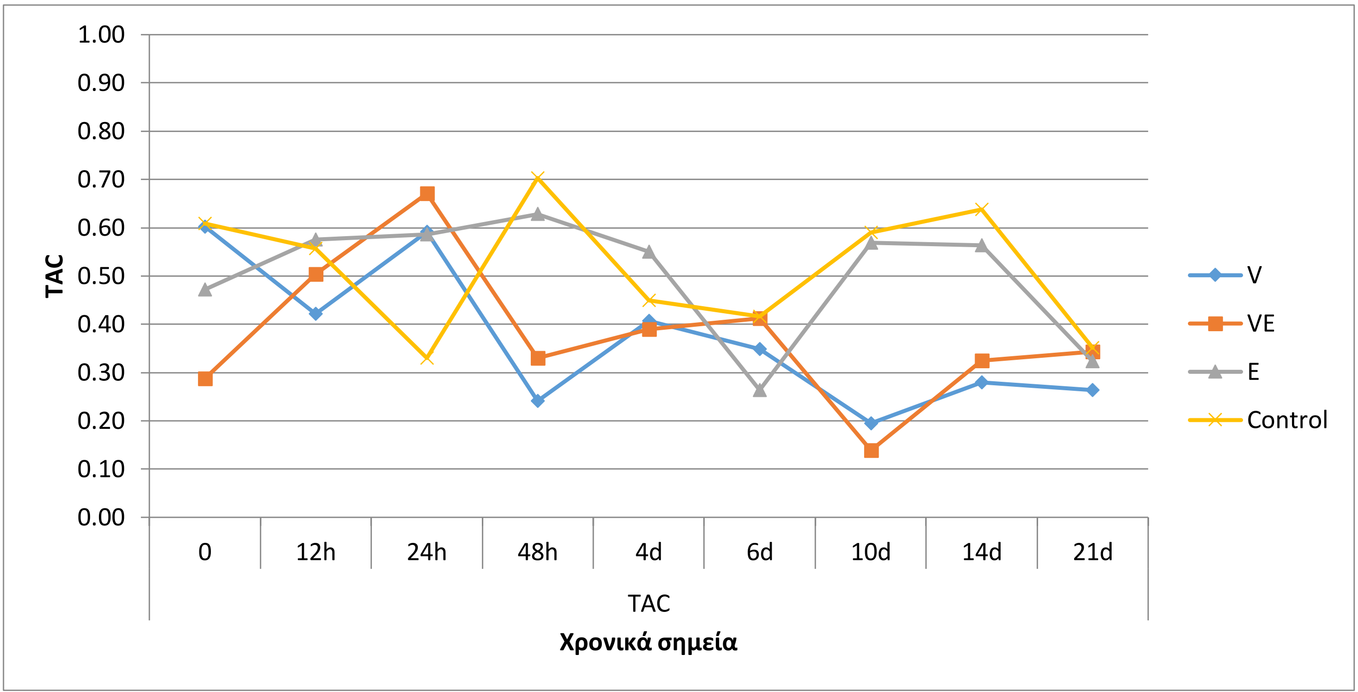
Πίνακας 7: Επιδράσεις (τιμές p) της ομάδας, ημέρας δειγματοληψίας (ημέρα) και οι αλληλεπιδράσεις τους στα επίπεδα των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης που αξιολογήθηκαν (TAC, GSH, TBARS και CAT).

Επίδραση	**Δείκτες οξειδοαναγωγής**			
	TAC	**GSH**	**TBARS**	**CAT**
Ομάδα	< 0,001	0,042	0,153	0,670
Ημέρα	< 0,001	< 0,001	< 0,001	<0,001
Ομάδα × Ημέρα	< 0,001	< 0,001	0,004	0,093

4.1 Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Συνολικά οι μέσοι όροι της TAC, (Πίνακας 8), επηρεάστηκαν σημαντικά από τη θεραπεία και ήταν σημαντικά χαμηλότεροι στις ομάδες V και VE σε σύγκριση με τις ομάδες C και E (p<0,05, Πίνακας 8). Συγκεκριμένα, τις ημέρες 6 (D6), 14 (D14) και 21 (D21) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα συνολικά επίπεδα της TAC από ό,τι στην πρώτη δειγματοληψία (0h) (p<0,05, Πίνακας 8). Στην ομάδα C και στην ομάδα E ο μέσος όρος τηςTAC σε όλες τις χρονικές στιγμές δεν διέφερε σε σύγκριση με τους μέσους όρους που καταγράφηκαν στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h, p>0,05, Πίνακας 8). Στην ομάδα V οι μέσοι όροι της TAC ήταν σημαντικά χαμηλότεροι τις ημέρες 2 (D2), 10 (D10), 14 (D14) και 21 (D21) σε σύγκριση με τον μέσο όρο της πρώτης δειγματοληψίας (0h) (p<0,05, Πίνακας 8). Στην ομάδα VE, ο μέσος όρος της TAC ήταν σημαντικά υψηλότερος την ημέρα 1 (D1) και σημαντικά χαμηλότερος την ημέρα 10 (D10) σε σχέση με την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h) (p<0,05, Πίνακας 8). Επιπλέον, τις ημέρες 2 (D2) και 10 (D10), οι μέσοι όροι της TAC στις ομάδες V και VE ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τις ομάδες C και E (p< 0,05, Πίνακας 8). Την ημέρα 14 (D14) η TAC στην ομάδα V ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότεροι σε σύγκριση με την ομάδα C και την ομάδα E, ενώ η TAC στην ομάδα VE ήταν σημαντικά χαμηλότερη μόνο σε σχέση με την ομάδα C (p<0,05, Πίνακας 8).

Διάγραμμα 1: Μεταβολή των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον χρόνο



Πίνακας 8: Μέσοι όροι ± SE της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) (mmol DPPH/L) που μετρήθηκαν σε όλες τις ομάδες προβατίνων κατά τη διάρκεια της μελέτης

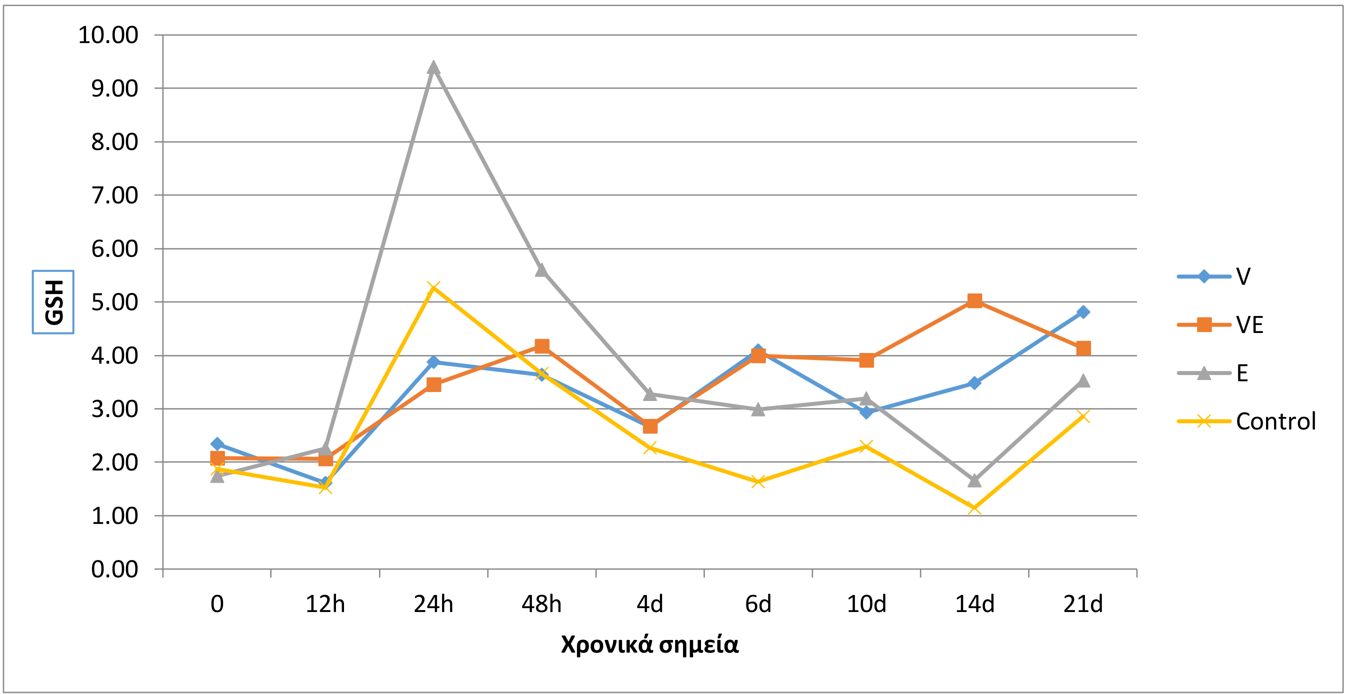
Χρόνος μετά τις χορηγήσεις	**Ομάδα**				**Συνολικά**
	Μάρτυρες	**E**	**V**	**VE**	
0h	0,61±0,03^{aA}	0,47±0,05^{abcA}	0,60±0,01^{bA}	0,45±0,04^{bcA}	0,52±0,03^{cd}
12h	0,51±0,04^{aA}	0,58±0,04^{bcA}	0,42±0,07^{abA}	0,50±0,11^{bcA}	0,51±0,03^{cd}
D1	0,55±0,04^{aA}	0,59±0,05^{bcA}	0,59±0,03^{bA}	0,67±0,03^{cA}	0,59±0,03^{d}
D2	0,67±0,05^{aA}	0,63±0,15^{cA}	0,24±0,04^{aB}	0,33±0,01^{abB}	0,46±0,03^{bc}
D4	0,46±0,01^{aA}	0,55±0,03^{bcA}	0,41±0,02^{abA}	0,39±0,03^{bA}	0,44±0,03^{bc}
D6	0,41±0,04^{aA}	0,33±0,02^{aA}	0,35±0,03^{abA}	0,41±0,04^{bA}	0,37±0,03^{ab}
D10	0,59±0,05^{aA}	0,57±0,03^{bcA}	0,20±0,05^{aB}	0,14±0,02^{aB}	0,37±0,03^{ab}
D14	0,69±0,03^{aA}	0,56±0,03^{bcAC}	0,28±0,02^{aB}	0,33±0,03^{abC}	0,45±0,03^{bc}
D21	0,35±0,04^{aA}	0,32±0,04^{aA}	0,26±0,03^{aA}	0,34±0,02^{abA}	0,31±0,03^{a}
Συνολικά	0,53±0,02^{A}	0,50±0,02^{A}	0,37±0,02^{B}	0,41±0,02^{B}	

^{A,B,C} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δείχνουν σημαντική διαφορά ($p<0,05$)
^{a,b,c,d} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη δείχνουν σημαντική διαφορά ($p<0,05$)

4.2 Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH)

Συνολικά οι μέσοι όροι της GSH ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι στην ομάδα E σε σχέση με την C ($p<0,05$, Πίνακας 9), ενώ καμία άλλη διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των υπολοίπων ομάδων ($p>0,05$). Συνολικά ο μέσος όρος της GSH ήταν σημαντικά υψηλότερος τις ημέρες 1 (D1), 2 (D2), 6 (D6) και 21 (D21) σε σύγκριση με την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h) (p<0,05, Πίνακας 9). Ωστόσο την ημέρα 1 (D1) ο μέσος όρος της GSH στην ομάδα Ε ήταν σημαντικά υψηλότερος από όλες τις άλλες ομάδες, ενώ την ημέρα 14 (D14) ο μέσος όρος της GSH ήταν σημαντικά υψηλότερος στην ομάδα VE από τις ομάδες C και E (p<0,05, Πίνακας 9). Στην ομάδα C, ο μέσος όρος της GSH παρέμεινε σταθερός μεταξύ των χρονικών σημείων και δεν ανιχνεύθηκε σημαντική διαφορά (p>0,05, Πίνακας 9). Στην ομάδα E, ο μέσος όρος της GSH την ημέρα 1 (D1) ήταν σημαντικά υψηλότερος από όλες τις άλλες χρονικές στιγμές, καθώς και την ημέρα 2 (D2) ήταν υψηλότερος σε σύγκριση με την πρώτη δειγματοληψία (0h) (p<0,05, Πίνακας 9). Στην ομάδα V, ο μέσος όρος της GSH ήταν σημαντικά υψηλότερος την ημέρα 21 (D21) σε σύγκριση με την πρώτη δειγματοληψία (0h), ενώ στην ομάδα VE ήταν υψηλότερος την ημέρα 14 (D14) σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία ((0h) (p<0,05, Πίνακας 9).

Διάγραμμα 2: Μεταβολή των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στον χρόνο



Πίνακας 9: Μέσοι όροι ± SE της γλουταθειόνης (GSH) (μmol/gr Hb) που μετρήθηκαν σε όλες τις ομάδες προβατίνων κατά τη διάρκεια της μελέτης

Χρόνος δειγματοληψίας	Ομάδα				Συνολικά
	Μάρτυρες	E	V	VE	
0h	1,59±0,35^aA	1,75±0,09^aA	2,34±0,37^abA	2,08±0,37^aA	2,02±0,23^ab
12h	1,26±0,23^aA	2,26±0,21^aA	1,61±0,28^aA	2,06±0,37^aA	1,87±0,23^a
D1	3,58±0,30^aA	9,40±1,18^cB	3,88±0,46^abcA	3,46±0,76^abA	5,17±0,23^e
D2	3,73±0,63^aA	5,60±0,30^bA	3,64±0,39^abcA	4,18±0,48^abA	4,36±0,23^de
D4	2,19±0,51^aA	3,28±0,39^abA	2,66±0,18^abcA	2,68±0,52^abA	2,78±0,23^ab
D6	1,69±0,27^aA	3,00±0,20^aA	4,10±0,46^bcA	3,99±0,74^abA	3,27±0,23^c
D10	2,30±0,78^aA	3,20±0,36^aA	2,93±0,59^abcA	3,91±0,44^abA	3,16±0,23^bc

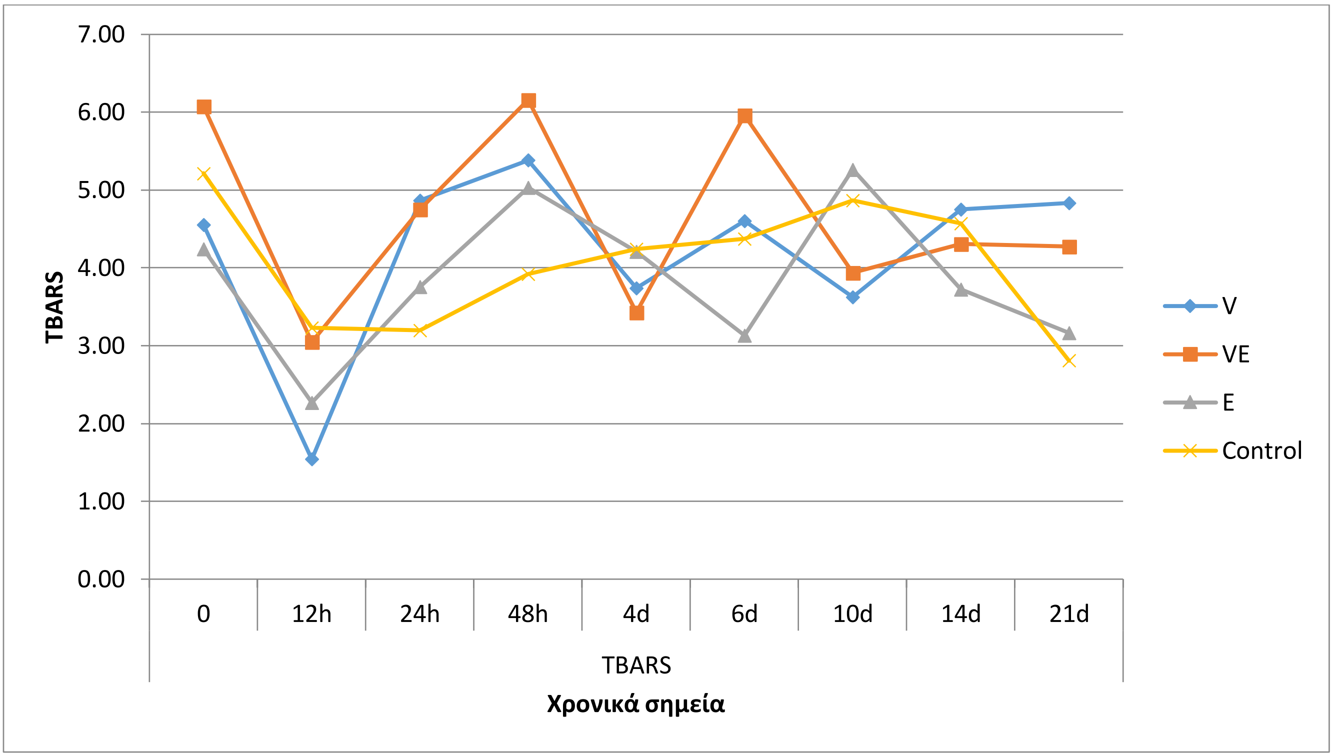
D14	$1,15 \pm 0,23^{aA}$	$1,66 \pm 0,30^{aA}$	$3,48 \pm 0,65^{abcAB}$	$5,02 \pm 0,58^{bB}$	$2,90 \pm 0,23^{b}$
D21	$2,86 \pm 0,70^{aA}$	$3,53 \pm 0,30^{abA}$	$4,81 \pm 0,44^{cA}$	$4,14 \pm 0,59^{abA}$	$3,91 \pm 0,23^{cd}$
Συνολικά	$2,47 \pm 0,34^{A}$	$3,82 \pm 0,31^{A}$	$3,35 \pm 0,31^{A}$	$3,58 \pm 0,31^{A}$	

^{A,B,C} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν σημαντική διαφορά (p<0,05)
^{a,b,c,d} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν σημαντική διαφορά (p<0,05)

4.3 Επίπεδα ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν σημαντική μείωση στα δείγματα των 12 ωρών (12h) σε σύγκριση με τα δείγματα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h) (Διάγραμμα 3) (p<0,05, Πίνακας 10). Στη συνέχεια παρουσίασαν σημαντική αύξηση την ημέρα 1 (D1) και παρέμειναν σημαντικά υψηλότερα από τα δείγματα των 12 ωρών (12h) μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (p<0,05, Πίνακας 10). Στην ομάδα C, ο μέσος όρος των TBARS δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των χρονικών σημείων, αν και παρατηρήθηκε μια μείωση στις 12 ώρες σε σύγκριση με την τιμή των TBARS πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h) (p>0,05, Πίνακας 10). Παρόμοια αριθμητική μείωση παρατηρήθηκε επίσης στην ομάδα E και ο μέσος όρος των TBARS ήταν σημαντικά υψηλότερος την ημέρα 10 (D10) σε σύγκριση με τις 12 ώρες (12h) (P<0,05, Πίνακας 10). Η μείωση των TBARS μεταξύ των 0h και 12h ήταν σημαντική στις ομάδες V και VE. Συγκεκριμένα στην ομάδα V, ο μέσος όρος των TBARS αυξήθηκε σημαντικά την ημέρα 1 (D1) και παρέμεινε σημαντικά υψηλότερος από το χρονικό σημείο των 12 ωρών (12h) μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (p<0,05, Πίνακας 10). Στην ομάδα VE ο μέσος όρος των TBARS αυξήθηκε σημαντικά την ημέρα 2 (D2) σε σύγκριση με τις 12 ώρες (12h) (p<0,05, Πίνακας 10), αλλά οι τιμές που καταγράφηκαν τις επόμενες χρονικές στιγμές δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τις 12 ώρες (12h) (p>0,05, Πίνακας 10).

Διάγραμμα 3: Μεταβολή των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στον χρόνο



Πίνακας 10: Μέσοι όροι ± SE των TBARS (μmol/L) που μετρήθηκαν σε όλες τις ομάδες προβατίνων κατά τη διάρκεια της μελέτης

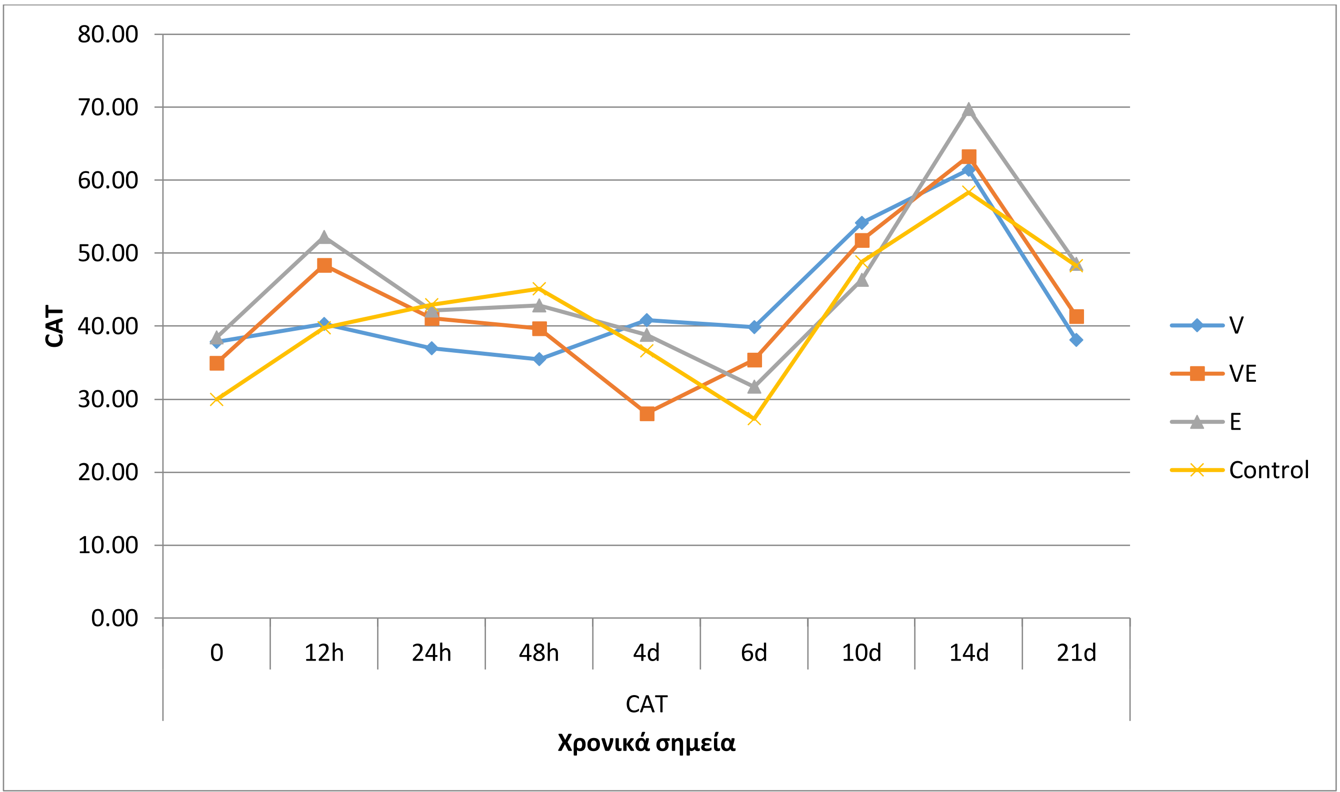
Χρόνος δειγματοληψίας	**Ομάδα**				**Συνολικά**
	Μάρτυρες	**E**	**V**	**VE**	
0h	$5{,}24\pm0{,}53^{aA}$	$4{,}24\pm0{,}81^{abA}$	$4{,}55\pm0{,}75^{Ba}$	$6{,}08\pm0{,}26^{bA}$	$5{,}05\pm0{,}28^{cd}$
12h	$2{,}93\pm0{,}31^{aA}$	$2{,}27\pm0{,}23^{aA}$	$1{,}54\pm0{,}13^{aA}$	$3{,}05\pm0{,}79^{aA}$	$2{,}47\pm0{,}28^{a}$
D1	$3{,}18\pm0{,}40^{aA}$	$3{,}76\pm0{,}56^{abA}$	$4{,}87\pm0{,}98^{bA}$	$4{,}75\pm0{,}52^{abA}$	$4{,}16\pm0{,}28^{bcd}$
D2	$3{,}80\pm0{,}26^{aA}$	$5{,}03\pm0{,}65^{abA}$	$5{,}38\pm0{,}28^{bA}$	$6{,}16\pm0{,}92^{bA}$	$5{,}12\pm0{,}28^{d}$
D4	$4{,}00\pm0{,}39^{aA}$	$4{,}21\pm0{,}56^{abA}$	$3{,}74\pm0{,}99^{abA}$	$3{,}43\pm0{,}32^{abA}$	$3{,}86\pm0{,}28^{bc}$
D6	$4{,}12\pm0{,}41^{aA}$	$3{,}13\pm0{,}23^{abA}$	$4{,}60\pm0{,}21^{bA}$	$5{,}96\pm0{,}73^{abA}$	$4{,}48\pm0{,}28^{bcd}$
D10	$4{,}87\pm0{,}52^{aA}$	$5{,}27\pm0{,}57^{bA}$	$3{,}63\pm0{,}14^{abA}$	$3{,}94\pm0{,}43^{abA}$	$4{,}45\pm0{,}28^{bcd}$
D14	$4{,}57\pm0{,}72^{aA}$	$3{,}73\pm0{,}23^{abA}$	$4{,}75\pm0{,}29^{bA}$	$4{,}31\pm0{,}12^{abA}$	$4{,}36\pm0{,}28^{bcd}$
D21	$2{,}81\pm0{,}26^{aA}$	$3{,}16\pm0{,}26^{abA}$	$4{,}83\pm0{,}35^{bA}$	$4{,}27\pm0{,}23^{abA}$	$3{,}79\pm0{,}28^{b}$
Συνολικά	$3{,}97\pm0{,}20^{A}$	$3{,}89\pm0{,}20^{A}$	$4{,}23\pm0{,}20^{A}$	$4{,}68\pm0{,}20^{A}$	

^{A,B,C} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν σημαντική διαφορά (p<0,05)
^{a,b,c,d} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν σημαντική διαφορά (p<0,05)

4.4 Επίπεδα Καταλάσης (CAT)

Συνολικά οι μέσοι όροι της CAT ήταν σημαντική υψηλότεροι στις 12 ώρες (12h) και τις ημέρες 10 (D10) και 14 (D14) σε σύγκριση με πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h) (p<0,05, Πίνακας 11). Την ημέρα 14 (D14), σε όλες τις ομάδες παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (0h), αλλά η διαφορά ήταν σημαντική μόνο στην ομάδα VE ($p<0,05$, Πίνακας 11). Γενικά, μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($p>0,05$, Πίνακας 11).

Διάγραμμα 4: Μεταβολή των επιπέδων της καταλάσης (CAT) στον χρόνο



Πίνακας 11: Μέσοι όροι ± SE της καταλάσης (U/mg Hb) που μετρήθηκαν σε όλες τις ομάδες προβατίνων κατά τη διάρκεια της μελέτης

Χρόνος δειγματοληψίας	**Ομάδα**				**Συνολικά**
	Μάρτυρες	**E**	**V**	**VE**	
0h	32,04±2,33^{abA}	38,43±1,69^{abA}	37,86±4,15^{abA}	34,97±3,06^{abA}	35,86±2,15^{ab}
12h	41,83±2,46^{abA}	52,23±3,28^{abA}	40,29±3,52^{abA}	48,41±5,51^{abA}	45,72±2,15^{cd}
D1	43,68±4,85^{abA}	42,13±4,62^{abA}	36,96±3,25^{abA}	41,07±4,63^{abA}	40,99±2,15^{abc}
D2	49,95±3,27^{abA}	42,85±2,70^{abA}	35,45±2,23^{aA}	39,67±1,87^{abA}	42,01±2,15^{abc}
D4	38,54±2,23^{abA}	38,83±2,49^{abA}	40,83±6,55^{abA}	28,07±2,32^{aA}	36,60±2,15^{abc}
D6	27,70±0,67^{aA}	31,68±3,25^{aA}	39,89±2,28^{abA}	35,41±4,51^{abA}	33,70±2,15^{a}
D10	48,85±8,13^{abA}	46,31±3,19^{abA}	54,11±6,72^{abA}	51,77±3,82^{bcA}	50,29±2,15^{d}
D14	58,32±5,87^{bA}	69,74±4,26^{bA}	61,44±7,15^{bA}	63,29±4,11^{cA}	63,23±2,15^{e}
D21	48,27±6,88^{abA}	48,57±3,24^{abA}	38,09±4,19^{abA}	41,33±4,80^{abA}	44,09±2,15^{abcd}
Συνολικά	43,27±2,19^{A}	45,67±2,19^{A}	42,8±2,19^{A}	42,70±2,19^{A}	

^{A,B,C} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά υποδηλώνουν σημαντική διαφορά ($p<0,05$)
^{a,b,c,d} Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν σημαντική διαφορά ($p<0,05$)

5. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη στην οποία αξιολογείται η οξειδοαναγωγική κατάσταση προβατίνων που βρίσκονται στον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης, σε επαναλαμβανόμενα διαστήματα σε σύντομο χρονικό διάστημα 21 ημερών μετά τον εμβολιασμό έναντι των κλωστριδιακών λοιμώξεων. Πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά τον ετήσιο αναμνηστικό εμβολιασμό, καθώς εφαρμόζεται σε όλα τα ζώα μίας εκτροφής και, ειδικότερα, σε ζώα σε ένα κρίσιμο παραγωγικό στάδιο, όταν η παραγωγή ROS είναι άφθονη. Η περίοδος δειγματοληψίας ορίστηκε στις 21 ημέρες για να περιλαμβάνει, τουλάχιστον, την ελάχιστη χρονική περίοδο των 2 εβδομάδων, κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται, μετά την είσοδο ενός αντιγόνου, για την παραγωγή αντιγονο-ειδικών αντισωμάτων. Όσον αφορά τη συχνότητα των αιμοληψιών, καθώς δεν υπάρχει αντίστοιχο δημοσιευμένο πρωτόκολλο στη βιβλιογραφία και λαμβάνοντας υπόψη το στρες που προκαλείται από την χορήγηση του ίδιου του εμβολίου, επιχειρήθηκε να αξιολογηθούν οι δείκτες οξειδωαναγωγικής κατάστασης σε πολύ σύντομα και επανειλημμένα χρονικά διαστήματα αμέσως μετά τον εμβολιασμό και σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στις επόμενες εβδομάδες.

Στις περισσότερες προηγούμενες μελέτες, η ισορροπία οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών ουσιών ύστερα από ενεργητική ανοσοποίηση είχε αξιολογηθεί σε μεγαλύτερα διαστήματα, δηλαδή 2 εβδομάδες ή περισσότερο μετά τον εμβολιασμό (Anugu et al., 2013; Al-Khafaji et al., 2012; Çiftci & Çiftci, 2021; Anugu, 2009; Ramos et al., 2010; Kumar et al., 2017). Η παρούσα μελέτη κατέδειξε μείωση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εμβολιασμένων προβατίνων σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες. Όμως, δεν διαπιστώθηκε αξιοσημείωτο οξειδωτικό στρες μετά τον ετήσιο αναμνηστικό εμβολιασμό εγκύων προβατίνων με πολυδύναμο εμβόλιο έναντι των κλωστριδιακών λοιμώξεων, όπως υποδεικνύεται από τα χαμηλά επίπεδα των TBARS, ενός δείκτη υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Ωστόσο, σαφής αντιοξειδωτική δράση της χορήγησης βιταμίνης Ε και Se καταγράφηκε μόνο στις προβατίνες της ομάδας Ε, όπου δεν πραγματοποιήθηκε ενεργητική ανοσοποίηση με τη χορήγηση εμβολίου. Η αντιοξειδωτική δράση συμπληρώματος βιταμίνης Ε εξαρτάται από τη δόση και την οδό που χορηγείται, παρουσιάζοντας ταχεία αύξηση την 8η ώρα ύστερα από μία μόνο ενδομυϊκή χορήγηση και στη συνέχεια ταχεία μείωση (Njeru et al., 1992).

Η μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) αποτελεί έναν μη ειδικό δείκτη οξειδωτικού στρες για την αξιολόγηση της επίδρασης μιας αγωγής στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, καθώς μπορεί να περιγράψει τη δυναμική ισορροπία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στην κυκλοφορία του αίματος ενός ζώου (Celi, 2010). Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πρόβατα εμβολιασμένα έναντι της βρουκέλλωσης (Rev.1) (Çiftci & Çiftci, 2021), η συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση μειώθηκε ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό. Στην παρούσα έρευνα το χαμηλότερο επίπεδο της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) παρατηρήθηκε στις εμβολιασμένες προβατίνες στις 2 και 10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, τόσο στην ομάδα V όσο και στην VE σε σύγκριση με τις ομάδες C και E ($p<0,05$) και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό μόνο στην ομάδα V σε σύγκριση με τις άλλες τρεις ομάδες. Το τελευταίο μπορεί να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης Ε και Se στις εμβολιασμένες προβατίνες της ομάδας VE. Επιπλέον, σε μία μελέτη σε βοοειδή, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα βρέθηκε μειωμένη 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ανασυνδυασμένα αντιγόνα έναντι κροτώνων. Το μειωμένο αυτό οξειδωτικό στρες συσχετίστηκε με την καλύτερη ανοσο-απόκριση που προκάλεσαν κάποια εμβόλια έναντι των κροτώνων (Contreras et al., 2020). Ωστόσο, στην παρούσα διπλωματική εργασία, την ημέρα 21 τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ομαλοποιήθηκαν μεταξύ των ομάδων, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με το διαφορετικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε και το γεγονός ότι πλησίαζε η ημέρα του τοκετού .

Σχετικά με τη γλουταθειόνη, το υψηλότερο επίπεδο GSH καταγράφηκε στην ομάδα Ε 24 ώρες μετά την χορήγηση της βιταμίνης Ε και Se. Στη συνέχεια τα επίπεδα GSH παρέμειναν υψηλότερα από ό,τι στις άλλες τρεις ομάδες μέχρι την ημέρα 4. Αυτή η αύξηση των επιπέδων GSH 24 ώρες μετά τη χορήγηση βιταμίνης Ε και Se στην ομάδα Ε μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η ίδια η βιταμίνη Ε δρα ως αντιοξειδωτικό. Από την άλλη πλευρά, οι βιολογικές δράσεις του σεληνίου οφείλονται κυρίως στην ενσωμάτωσή του στις σεληνοπρωτεΐνες, ιδιαίτερα στο ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) που αφαιρεί δυνητικά επιβλαβή υπεροξείδια του υδρογόνου και προστατεύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος από βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Salman et al., 2009). Η GPx μπορεί να ρυθμίσει μια αλυσιδωτή αντίδραση που καταλύει τον σχηματισμό προσταγλανδινών, λευκοτριενίων, προστακυκλινών και θρομβοξανών και σχετίζεται με τη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Leal et al., 2010). Το Se έχει επίσης αποδειχθεί ότι βελτιώνει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ενώ απαιτείται για την ανάπτυξη και έκφραση μη ειδικών χυμικών και κυτταρομεσολαβούμενων ανοσο-αποκρίσεων. Το Se είναι επίσης συστατικό του ενζύμου δεϊωδινάση τύπου Ι, το οποίο απαιτείται για τη μετατροπή της θυροξίνης (T4) στην πιο δραστική ορμόνη τριιωδοθυρονίνη (T3) (Kumar et al., 2017). Δεδομένου του εκτεταμένου αριθμού σεληνοπρωτεϊνών, υπάρχουν μηχανισμοί που ρυθμίζουν την προτεραιότητα χρήσης του σεληνίου, σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού. Αυτή η ιεραρχία επηρεάζει όχι μόνο τη χρήση του σεληνίου στον ίδιο ιστό, αλλά και την κατακράτηση σεληνίου σε άλλους ιστούς, καθορίζοντας τη διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε ιστού (Rooke et al., 2004). Αντίστοιχα, η χορήγηση βιταμίνης Ε και Se σε έγκυες προβατίνες ένα μήνα πριν από τον τοκετό (Morgante et al., 1999) και σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής κατά τα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης (Lacetera et al., 1996) έχει βρεθεί ότι προκαλεί αύξηση στη δραστικότητα της GPx στο αίμα. Ομοίως, σε αρσενικούς εμβολιασμένους αμνούς η χρήση συμπληρώματος διατροφής με οργανικό ή ανόργανο Se βρέθηκε ότι βελτιώνει τη δραστικότητα της GPx από την 30ή ημέρα μετά τον εμβολιασμό (Kumar et al., 2017). Η βιταμίνη Ε αποτελεί το πιο σημαντικό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες (Kay et al., 1986). Έχει την ικανότητα να απομακρύνει δραστικές μορφές οξυγόνου, μειώνοντας έτσι τον σχηματισμό υπεροξειδίων που μπορούν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων (Butterick et al., 1983; Sharmanov et al., 1990). Κατ' αυτόν τον τρόπο αποτρέπει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και επομένως προστατεύει τη λιπιδική μεμβράνη, τους υποδοχείς και άλλα κυτταρικά συστατικά που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Μια σειρά μελετών έχει δείξει ότι σε κύτταρα μολυσμένα με διαφορετικά είδη παρασίτων, οι ποσότητες των ROS που μπορούν να προκαλέσουν υπεροξείδωση των λιπιδίων ήταν αυξημένες, προκαλώντας κυτταρική βλάβη (Leal et al., 2010; Meydani, 1995). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την αύξηση των επιπέδων GSH 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στην ομάδα VE, περίοδο κατά την οποία οι τίτλοι αντισωμάτων αναμένοταν να αυξηθούν (Cooper, 1976). Σε αντίθεση με τα παρόντα αποτελέσματα της GSH, σε έγκυες προβατίνες που εμβολιάστηκαν έναντι της βρουκέλλωσης, τα επίπεδα της GSH παρέμειναν χαμηλά τη 2^{η} και 4^{η} εβδομάδα και αυξήθηκαν μόνο μετά την 8^{η} εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό (Al-Khafarji et al., 2012), ενώ σε αίγες που εμβολιάστηκαν έναντι της βρουκέλλωσης ή είχαν προσβληθεί από *Brucella*, τα επίπεδα της GSH παρέμειναν χαμηλά 14 και 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και αυξήθηκαν 60 ημέρες αργότερα (Kumar et al., 2017), γεγονός που αποδόθηκε στα υψηλότερα επίπεδα τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Σύμφωνα με την προαναφερθείσα μελέτη, οι τιμές της καταλάσης (CAT) κορυφώθηκαν 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό έναντι της βρουκέλλωσης, γεγονός που είναι ενδεικτικό της αντιοξειδωτικής δράσης κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Σε μια μελέτη σε αίγες μολυσμένες με *Anaplasma spp* (Dhanasree et al., 2020) βρέθηκε σημαντική μείωση στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και αύξηση των επιπέδων της καταλάσης 10 ημέρες μετά τη χορήγηση της βιταμίνης Ε και Se, αλλά δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις τιμές της GSH. Σύμφωνα με τη μελέτη μας, η δραστικότητα της καταλάσης αυξήθηκε σημαντικά 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στην ομάδα VE, κάτι που είναι σύμφωνο με την προαναφερθείσα μελέτη ενώ, μπορεί να σχετίζεται με το διαφορετικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε και τη μείωση του οξειδωτικού στρες, γεγονός που υποδεικνύει ότι όλες οι προβατίνες πριν από τον τοκετό παρουσίασαν χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Mutinati et al., 2013).

Η οξειδααναγωγική κατάσταση κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος, την ηλικία, τον μικροβιακό παράγοντα και την ενεργητική ή παθητική ανοσοποίηση. Σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από τους Contreras et al., (2020) δεν παρατηρήθηκε υπεροξείδωση λιπιδίων κατά την ενεργητική ανοσοποίηση, κάτι που θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί από τα επίπεδα των TBARS της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν σημαντική μείωση 12 ώρες μετά τη έναρξη της πειραματικής διαδικασίας τόσο στην ομάδα VE όσο και στην ομάδα V. Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε νεογέννητα μοσχάρια, η χορήγηση βιταμίνης Ε οδήγησε σε μείωση των TBARS 12 και 24 ώρες μετά την παρεντερική χορήγηση ή τη χορήγηση μέσω της τροφής (Mokhber-Dezfouli et al., 2008). Μείωση των TBARS παρατηρήθηκε επίσης σε πρόβατα που μολύνθηκαν πειραματικά με παράσιτα και έλαβαν συμπλήρωμα διατροφής με Se ή βιταμίνη Ε και Se (Leal et al., 2010). Ωστόσο, σε άλλη μελέτη (Al-Khafaji et al., 2012) παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα μηλονδιαλδεΰδης σε έγκυες προβατίνες που εμβολιάστηκαν έναντι της βρουκέλλωσης, 4 ή 8 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης δεν μπορεί να συγκριθεί με προηγούμενες μελέτες, καθώς ακολουθήθηκαν διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα και χορηγήθηκαν διαφορετικά εμβόλια σε διαφορετικά είδη και διαφορετικές ηλικίες. Παρά τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν εντός της κάθε ομάδας που συμμετείχε στην παρούσα μελέτη, τα TBARS δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των ομάδων, είτε συνολικά είτε σε κάθε χρονική στιγμή. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο εμβολιασμός έναντι των κλωστριδιακών λοιμώξεων δεν σχετίζεται με σημαντική υπεροξείδωση των λιπιδίων. Θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα ζώα που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν ήδη ανοσοποιηθεί περισσότερες από μία φορές στο παρελθόν με το ίδιο εμβόλιο. Επιπλέον, οι προβατίνες τρέφονταν επαρκώς με ένα ισορροπημένο σιτηρέσιο που περιείχε τις απαραίτητες βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και μακροστοιχεία που μπορεί να υποστηρίξουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εγκύων προβατίνων ώστε να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την ενεργητική ανοσοποίηση.

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η ενισχυτική ανοσοποίηση έναντι των κλωστριδιακών λοιμώξεων δεν σχετίζεται με σημαντικό οξειδωτικό στρες σε έγκυες προβατίνες τον τελευταίο μήνα πριν από τον αναμενόμενο χρόνο τοκετού. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί εάν αυτά τα εμβόλια έχουν το ίδιο αποτέλεσμα στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ζώων κατά την πρώτη ενεργητική ανοσοποίηση και εάν ο εμβολιασμός έναντι άλλων λοιμώξεων επηρεάζει την ισορροπία οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών.

Βιβλιογραφία

1. Abuelo, A. et al. (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), pp. 1003–1016. doi: https://doi.org/10.1111/jpn.12273.
2. Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biology and Endocrinology, v.28, n.3, 2005.
3. Al-Khafaji, W.; Al-Farwachi, M. Antioxidant status in pregnant ewes vaccinated with Rev 1 against brucellosis. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 2012, 26, doi:10.33899/ijvs.2012.46890.
4. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 78:6858-62, 1981.
5. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H2O2 detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 33(9):1260-7, 2002.
6. Anugu, S. Influence of Vitamin E on Innate and Humoral Components of the Immune System of Pregnant Ewes and Their Lambs. Open Access Master's Theses, University of Rhode Island, 2009.
7. Anugu, S., & Petersson-Wolfe, C. S.; Combs, G. F.; Petersson, K. H. . Effect of vitamin E on the immune system of ewes during late pregnancy and lactation. Small Ruminant Research 2013, 111, 83-89, doi:10.1016/j.smallrumres.2012.10.010.
8. *Aqil F., Radha Munagala, Manicka V. Vadhanam, Hina Kausar, Jeyaprakash Jeyabalan, David J. Schultz, and Ramesh C., Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk, 2012.*
9. *Babior, B. M. (2000) ‘Phagocytes and oxidative stress’, The American Journal of Medicine, 109(1), pp. 33–44. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00481-2.*
10. Barillet, F. et al. 2001. “The French Lacaune Dairy Sheep Breed: Use in France and Abroad in the Last 40 Years.” In Livestock Production Science, Elsevier, 17–29.
11. Butterick, C.J.; Baehner, R.L.; Boxer, L.A.; Jersild, R.A., Jr. Vitamin E--a selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes. The American journal of pathology 1983, 112, 287-293.
12. Castillo, C. et al. (2013) ‘Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production’, The Scientific World Journal, 2013. doi: 10.1155/2013/616098.

13. Celi P.; Bush D.R. Pregnancy, lambing and survival. In: COTTLE, D. (Ed.) International sheep and wool handbook. Nottingham University Press, 2010. p.223-257.
14. Celi, P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Rev. Bras. De Zootec.* **2010**, *39*, 348–363. https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300038
15. Çiftci, G., & Çiftci, A. . The assessment of the protein profiles and oxidant/antioxidat status in conjunctival Brucella melitensis Rev1 vaccinated sheep. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2021, 32, 101-106, doi:10.35864/evmd.934452.
16. Contreras, M.; Peres Rubio, C.; de la Fuente, J.; Villar, M.; Merino, O.; Mosqueda, J.; Ceron, J.J. Changes in Serum Biomarkers of Oxidative Stress in Cattle Vaccinated with Tick Recombinant Antigens: A Pilot Study. Vaccines 2020, 9, doi:10.3390/vaccines9010005.
17. Cooper, B.S. The transfer from ewe to lamb of clostridial antibodies. New Zealand veterinary journal 1976, 15, 1-7, doi:10.1080/00480169.1976.33676.
18. Dhanasree, G.; Pillai, U.N.; Deepa, C.; Ambily, V.R.; Shynu, M.; Sunanda, C. Evaluation of oxidative stress in caprine anaplasmosis and effect of vitamin E-selenium in monitoring oxidative stress. Tropical animal health and production 2020, 52, 2695-2698, doi:10.1007/s11250-019-02175-8.
19. Dønnem, I.; Randby, Å.T.; Hektoen, L.; Avdem, F.; Meling, S.; Våge, Å.Ø.; Ådnøy, T.; Steinheim, G.; Waage, S. Effect of vitamin E supplementation to ewes in late pregnancy on the rate of stillborn lambs. Small Ruminant Research 2015, 111, doi:10.1016/j.smallrumres.2015.02.012.
20. Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants – A review. J Photochem Photobiol B 1997, 41:189– 200
21. Esterbauer, Hermann et al. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors, Mutation Research.
22. Fang YZ, Yang S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 2002, 18:872–879
23. Fernandez-Miyakawa, M.E.; Redondo, L.M. Role of Clostridium perfringens Alpha, Beta, Epsilon and Iota toxins in Entero-toxemia of monogastrics and Ruminants. In Microbial Toxins, Gopalakrishnakone, P., Stiles, B., Alape-Girón, A., Dubreuil, J.D., Mandal, M., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; pp. 1-26.
24. Fthenakis, G.C.; Arsenos, G.; Brozos, C.; Fragkou, I.A.; Giadinis, N.D.; Giannenas, I.; Mavrogianni, V.S.; Papadopoulos, E.; Valasi, I. Health management of ewes during pregnancy. Animal reproduction science 2012, 130, 198-212, doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.016.
25. Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH, 2010: Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. J Endocrinol 205, 107–116
26. Giles, G. I. et al. (2017) 'The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On', Antioxidants 2017, Vol. 6, Page 38, 6(2), p. 38. doi: 10.3390/ANTIOX6020038.
27. Goff W.L.; Carl Johnson W.; Wyatt C.R. et al. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.55, p.45-62, 1996.
28. Gomes, E.C., A.N. Silva, and M.R. de Oliveira, *Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species.* Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 756132.
29. Gruhlke, M. C. H. and Slusarenko, A. J. (2012) 'The biology of reactive sulfur species (RSS)', Plant Physiology and Biochemistry, 59, pp. 98–107. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2012.03.016.
30. Guerin P.; El Mouatassim S.; Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update, v.7, p.175-189, 2001.
31. Haenlein, G. F.W. 2007. "About the Evolution of Goat and Sheep Milk Production." Small Ruminant Research 68(1–2): 3–6.
32. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition.

33. Halliwell, B. (2007) ‘Biochemistry of oxidative stress.’, Bioxhemical Society transactions, 35, (Pt 5), pp. 1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147.
34. Hampton, M. B., Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C. (1998) ‘Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing’, Blood, 92(9), pp. 3007–3017. doi: 10.1182/BLOOD.V92.9.3007.421K47_3007_3017.
35. Hatziminaoglou, Y., and J. Boyazoglu. 2004. “The Goat in Ancient Civilisations: From the Fertile Crescent to the Aegean Sea.” In Small Ruminant Research, Elsevier, 123–29.
36. Hernández-Camacho, J. D. et al. (2018) ‘Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease’, Frontiers in Physiology, 9(FEB), p. 44. doi: 10.3389/FPHYS.2018.00044/BIBTEX.
37. Jackson, S.K.P.a.M.J., *exercise-induced oxidative stress: Cellular Mechanisms and impact on muscle force Production.* 2010.
38. Johns DP. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal 2006, 8:1865–1879
39. Juan, C. A. et al. (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), p. 4642. doi: 10.3390/IJMS22094642.
40. Kay, M.M.; Bosman, G.J.; Shapiro, S.S.; Bendich, A.; Bassel, P.S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1986, 83, 2463-2467, doi:10.1073/pnas.83.8.2463.
41. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000, 267:4928–4944 JOHNS DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006, 8:1865–1879
42. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis.* Toxicol Pathol, 2010. **38**(1): p. 96-109.
43. Knight, J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of clinical and laboratory science* **2000**, *30*, 145-158.
44. Komine K.-I.; Kuroishi T.; Komine Y. et al. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on staphylococcal enterotoxin c-stimulated bovine mammary gland cells. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v.11, p.203-210, 2004.
45. Kumar, A.G., VK.; Verma, AK.; Rajesh, M.; Anu, R.; Yadav, S.K. Lipid Peroxidation and Antioxidant System in Erythrocytes of Brucella Vaccinated and Challenged Goats. Int J Vaccines Vaccin 2017, 4, 00092, doi:10.15406/ijvv.2017.04.00092.
46. Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Nardone, A. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. American journal of veterinary research 1996, 57, 1776-1780
47. Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., González, J. M., Ortín, A., & Fthenakis, G. C. (2015). *Vaccination schedules in small ruminant farms. Veterinary Microbiology, 181(1-2), 34–46.* doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.018
48. Lawrenz, M. B. et al. (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, p. 373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373.
49. Leal, M.L.; de Camargo, E.V.; Ross, D.H.; Molento, M.B.; Lopes, S.T.; da Rocha, J.B. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with Haemonchus contortus. Veterinary research communications 2010, 34, 549-555, doi:10.1007/s11259-010-9426-x.
50. Lewis, C. J. (2011). *Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 27(1), 121–126.* doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.009

51. Lewis, E. D., Meydani, S. N., & Wu, D. (2018). *Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. IUBMB Life.* doi:10.1002/iub.1976
52. Lu, J.M., et al., *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems.* J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 840-60.
53. Li, R., Jia, Z. and Trush, M. A. (2016) 'Defining ROS in Biology and Medicine HHS Public Access'. doi: 10.20455/ros.2016.803.
54. Lykkesfeldt J.; Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. The Veterinary Journal, v.173, 502-511, 2007.
55. Magnani, F. and Mattevi, A. (2019) 'Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases', Current Opinion in Structural Biology, 59, pp. 91–97. doi: 10.1016/J.SBI.2019.03.001.
56. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21(3):361–70.
57. Meydani, M. Vitamin E. Lancet 1995, 345, 170-175, doi:10.1016/s0140-6736(95)90172-8.
58. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic Biol Med 1990, 8:95–108
59. Mokhber-Dezfouli, M.R.; Rahimikia, E.; Asadi, F.; Nadalian, M.G. The role of route of vitamin E administration on the plasma antioxidant activity and lipid peroxidation in newborn calves. Basic & clinical pharmacology & toxicology 2008, 103, 414-418, doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00308.x.
60. Morgante, M.; Beghelli, D.; Pauselli, M.; Dall'Ara, P.; Capuccella, M.; Ranucci, S. Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes. Journal of dairy science 1999, 82, 623-631, doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75276-8.
61. Mukherji SM, Singh SP. Reaction mechanism in organic chemistry. Madras: Macmillan IndiaPress; 1986.
62. Mutinati, M.; Piccinno, M.; Roncetti, M.; Campanile, D.; Rizzo, A.; Sciorsci, R. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 2013, 48, 353-357, doi:10.1111/rda.12141.
63. Njeru, C.A.; McDowell, L.R.; Wilkinson, N.S.; Linda, S.B.; Williams, S.N.; Lentz, E.L. Serum alpha-tocopherol concentration in sheep after intramuscular injection of DL-alpha-tocopherol. Journal of animal science 1992, 70, 2562-2567, doi:10.2527/1992.7082562x.
64. Nordberg J, Arner EJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. Free Radical Biol Med. 2001;31(11):1287–312.
65. NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants.; The National Academic Press: Washington, DC, 2007.
66. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans.* Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(1): p. 2-12.
67. Panousis N., Brozos C., Fthenakis G. C. & Karatzias C. (2018). Pregnancy toxaemia of ewes. A literature review. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 52(2), 89–96. https://doi.org/10.12681/jhvms.15410
68. Patel, R. P. et al. (1999) 'Biological aspects of reactive nitrogen species', Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1411(2–3), pp. 385–400. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00028-6.
69. Pecoraro, B.M., Leal, D.F., Frias-De-Diego, A. *et al.* The health benefits of selenium in food animals: a review. *J Animal Sci Biotechnol* **13,** 58 (2022). https://doi.org/10.1186/s40104-022-00706-2
70. Pugh DG, Baird AN, Sheep and Goat Medicine, 2nd Edition, Elsevier, 2011.
71. Ramos, A.; Laguna, I.; de Lucia, M.L.; Martin-Palomino, P.; Regodon, S.; Miguez, M.P. Evolution of oxidative/nitrosative stress biomarkers during an open-field vaccination procedure in sheep: effect of melatonin. Veterinary immunology and immunopathology 2010, 133, 16-24, doi:10.1016/j.vetimm.2009.06.016.

72. Rannamäe E, Lõugas L, Speller CF, Valk H, Maldre L, Wilczyński J, et al. (2016) Three Thousand Years of Continuity in the Maternal Lineages of Ancient Sheep (Ovis aries) in Estonia. PLoS ONE 11(10): e0163676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163676
73. Rooke, J.A.R., J.J.; Arthur, J.R. Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. Journal of agricultural and food chemistry 2004, 142, 253-262.
74. Salman, S.; Khol-Parisini, A.; Schafft, H.; Lahrssen-Wiederholt, M.; Hulan, H.W.; Dinse, D.; Zentek, J. The role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function. Animal health research reviews 2009, 10, 21-34, doi:10.1017/S1466252308001588.
75. Salvi, A. et al. (2001) 'Structural damage to proteins caused by free radicals: asessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding', Biochemical Pharmacology, 61(10), pp. 1237–1242. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00607-4.
76. Scaletti R.W.; Trammell D.S.; Smith B.A. et al. Role of dietary copper in enhancing resistance to escherichia coli mastitis. Journal of Dairy Science, v.86, p.1240-1249, 2003.
77. Sharmanov, A.T.; Aidarkhanov, B.B.; Kurmangalinov, S.M. Effect of vitamin E deficiency on oxidative metabolism and antioxidant enzyme activity of macrophages. Annals of nutrition & metabolism 1990, 34, 143-146, doi:10.1159/000177580.
78. Sies, H. (2015) 'Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine', Redox Biology, 4, pp. 180–183. doi: 10.1016/J.REDOX.2015.01.002.
79. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 1–17. doi:10.1155/2019/6175804
80. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci. 2000;899:191–208.
81. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis.* Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
82. Spears, J. W., & Weiss, W. P. (2008). *Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. The Veterinary Journal, 176(1), 70–76.* doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.015
83. Takahashi M.; Keicho K.; Takahashi H. et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology, v.54, p.137-145, 2000.
84. Thompson, P.M.C.a.H.S., *antioxidants: What role do they play in physical activity and health.* 2000 Amer J Clin Nutr 72 (2): 637S-646S.
85. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
86. Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M. and Kouretas, D. (2012) 'Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration.', Cell stress & chaperones, 17(1), pp. 11–21. doi: 10.1007/s12192-011-0293-3.
87. Watson PJ, Scholes SF, Clostridium perfringens type D epsilon Intoxication in one –day-old Calves, Veterinary Record, 164:816, 2009.
88. Weiss W.P.; Hogan J.S.; Smith K.L. Changes in Vitamin C Concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. Journal of Dairy Science, v.87, p.32-37, 2004.
89. Yla-Herttuala S. Oxidized LDL and atherogenesis. Ann N Y Acad Sci. 1999;874:134–7.
90. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 2001; 29 (2): 358-62.
91. Zeder, Melinda A., and Brian Hesse. 2000. "The Initial Domestication of Goats (Capra Hircus) in the Zagros Mountains 10,000 Years Ago." Science 287(5461): 2254–57.

92. Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). International Journal of Molecular Medicine. doi:10.3892/ijmm.2019.4188
93. Ζυγογιάννης, Δ.Γ., (2006). Προβατοτροφία, Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΣύγχρονηΠαιδεία
94. Ν. Παπαγαλάνης (2014) 'Οξειδωτικό Στρες Και Ενδογενές Αντιοξειδωτικό Σύστημα. Ι. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου', Ελληνική Νεφρολογία, 26(3), pp. 151–194.
95. Ρογδάκης, Ε. (2006). Γενική ζωοτεχνία. Εκδόσεις ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.