



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρικός–τετρακέφαλος) κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, μετά από χορήγηση πόσιμου νερού με πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου»

“Assessment of oxidative stress markers in the tissues (kidney–quadriceps) of broiler chickens, after the administration of drinking water enriched with polyphenolic extracts from olive mill waste waters”



ΚΑΨΑΛΗ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Στάγκο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία και υποστήριξη που μου παρείχε.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την βοήθεια και την συνεχή παρουσία του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό, για την προσφορά του στο πείραμα, τόσο σε πρακτικό επίπεδο όσο και στην καθοδήγηση κατά την εκπόνησή του.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Διδάκτορα κ. Γερασόπουλο Κωνσταντίνο, ο οποίος τόσο με τις συμβουλές του όσο και με την συνεχή παρουσία στη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας βοήθησε στο μέγιστο βαθμό και συνέβαλε στην έγκαιρη ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους υπολοίπους συναδέλφους του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα συνεργασίας και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Καφαντάρη Ιωάννη και Μακρή Σωτηρία, οι οποίοι συνέβαλαν στη δειγματοληψία. Ευχαριστώ επίσης τους προπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Ζωικής Παραγωγής του ΤΕΙ Λάρισας, Μακρή Χαράλαμπο και Μειμάρη Αντώνιο καθώς και τον Προϊστάμενο του Κτηνοτροφικού Τμήματος του Αγροκτήματος του ΤΕΙ Λάρισας κ. Κόκκα Στυλιανό, για τη βοήθεια τους στην εκτροφή των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τα άτομα της οικογένειάς μου, όχι μόνο επειδή μου έδωσαν την ευκαιρία να σπουδάσω και να διευρύνω τους ορίζοντές μου, αλλά και για τη στήριξή τους σε ψυχολογικό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς τη στήριξή τους, ίσως να μην κατάφερνα να πετύχω τους στόχους μου ως προπτυχιακή φοιτήτρια, και για το λόγο αυτό θέλω να αφιερώσω σε αυτούς τη συγκεκριμένη εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στους ιστούς (τετρακέφαλο – νεφρικό) των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους. Στη διατροφή τους υπήρχε το προβλεπόμενο σιτηρέσιο, αλλά στο πόσιμο νερό τους προστέθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης. Τα κοτόπουλα χωρίστηκαν σε τρεις (3) ομάδες των είκοσι πέντε (25) ατόμων. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου. Στις άλλες δύο (2) ομάδες, όπως αναφέρθηκε, στο νερό τους το οποίο ανανεώνονταν καθημερινά, μετά την ηλικία των δεκαπέντε (15) ημερών, προστέθηκε πολυφαινολική σκόνη που παράγεται από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Πραγματοποιήθηκε μία συλλογή ιστών από δώδεκα (12) κοτόπουλα σε κάθε ομάδα, δηλαδή από τριάντα έξη (36) κοτόπουλα. Η ιστοληψία πραγματοποιήθηκε όταν τα κοτόπουλα ήταν εξήντα (60) ημερών και ελάμβαναν τα πολυφαινολικά πρόσθετα για σαράντα πέντε (45) ημέρες. Μετά από τη συλλογή των ιστών τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν άμεσα στο εργαστήριο. Ακολουθούσε η ομογενοποίηση των ιστών και κατόπιν ο προσδιορισμός των δεικτών του οξειδωτικού στρες όπως: ο προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 , η υπεροξειδωση των λιπιδίων (TBARS), η οξείδωση των πρωτεϊνών (protein carbonyls) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά και ενθαρρυντικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τον χρόνο, δείχνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η GSH στον τετρακέφαλο αυξάνεται στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά 17,2% στην πολυφαινολική ομάδα (ομάδα Β) που στο νερό είχε 20 μg/ml πολυφαινολικής σκόνης και 33,8% στην πολυφαινολική ομάδα (ομάδα Γ) που στο νερό είχε 50 μg/ml πολυφαινολικής σκόνης. Το ίδιο παρατηρείται και στον νεφρικό ιστό με αυξήσεις αντίστοιχα στις πολυφαινολικές ομάδες Β και Γ κατά 19,1% και 33,9%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η TAC στις πολυφαινολικές ομάδες αυξάνεται και στους δύο ιστούς, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Για παράδειγμα, η ομάδα Γ αυξάνει την TAC κατά 25,8% στον τετρακέφαλο και κατά 66,8% στον νεφρικό ιστό. Κατά συνέπεια, η παρουσίαση πολυφαινολών στο πόσιμο νερό, βοηθά στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους ιστούς.

ABSTRACT

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

The aim of the present study was to measure oxidative stress biomarkers in broiler chickens' tissues (kidney- quadriceps muscle), administrated with polyphenolic powder from processed olive mill waste waters, that was dissolved in drinking water, in order to examine the effect on their antioxidant status. The chickens were fed according to standard diet, but they were administrated with water, containing polyphenolic powder. The chickens were divided into three (3) groups of twenty five (25) subjects. Group A was the control group, which was administrated with drinking water without polyphenols, throughout the experiment. The other two (2) were administrated with polyphenolic water, each one of a different concentration. The water was freshened up, daily. After the age of sixty days (60), the chickens were slain. Kidney and quadricep muscle collection took place from twelve (12) subjects from each team. The samples were carried back to lab and were put into the refrigerator till they were studied more extensively. After the homogenization, biochemical analysis was performed for assaying reduced glutathione (GSH), catalase activity, total antioxidant capacity (TAC), TBARS and protein carbonyls.

To sum up, the results of this study were positive and encouraging. Polyphenolic additives affect the oxidative stress biomarkers' behavior in between groups presenting interesting results.. In particular, GSH in the quadriceps is statistically significant in relation to the control group, by 17.2% in the polyphenol group (group B) which in water had 20 µg / ml polyphenolic powder and 33.8% in the polyphenol group (group C) which in water had 50 µg / ml polyphenolic powder. The same is observed in kidney tissue with increases in polyphenolic groups B and C respectively by 19.1% and 33.9%, relative to the control group. In addition, TAC in polyphenolic groups increases in both tissues, relative to control groups. For example, Group C

increases the TAC by 25.8% in the quadriceps and by 66.8% in the kidney tissue. Consequently, the presentation of polyphenols in drinking water helps to increase total antioxidant capacity in tissues.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	13
1.1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	13
1.1.2. Τύποι ελευθέρων ριζών.....	14
1.1.3. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	16
1.1.3.1. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	16
1.1.3.2. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	19
1.1.4. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	19
1.1.4.1. Φυσιολογικοί ρόλοι ελευθέρων ριζών.....	20
1.1.4.2. Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	20
1.1.5. Αντιοξειδωτική άμυνα- Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	23
1.1.5.1. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών.....	24
1.2. Πολυφαινόλες.....	25
1.2.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών.....	25
1.2.2. Ιδιότητες πολυφαινολών.....	28
1.2.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	29
1.2.4. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.....	29
1.3. Σκοπός.....	30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1. Γενικά.....	31
2.2. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος.....	31
2.3. Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη.....	34
2.4. Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση.....	35
2.4.1. Ιστοληψία και μεταφορά στο εργαστήριο.....	35
2.4.2. Ομογενοποίηση.....	36
2.5. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	36
2.5.1. Γενικά.....	36
2.5.2. Μέθοδοι.....	36
2.5.2.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH).....	36
2.5.2.2. Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H ₂ O ₂	40
2.5.2.3. Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).....	43
2.5.2.4. Μέτρηση TBARS.....	46
2.5.2.5. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.....	48
2.5.2.6. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	51
2.6. Στατιστική Ανάλυση.....	51

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1. Ανηγμένη Γλουταθειόνη(GSH).....	52
3.2. Ρυθμός διάσπασης H ₂ O ₂	54
3.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC.....	56
3.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	58
3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	60
4. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

		Σελ.
Εικόνα 1.1	<i>Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα</i>	15
Εικόνα 1.2	<i>Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών</i>	16
Εικόνα 1.3	<i>Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες</i>	23
Εικόνα 1.4	<i>Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας</i>	24
Εικόνα 1.5	<i>Κατηγορίες πολυφαινολών</i>	28
Εικόνα 2.1	<i>Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος</i>	32
Εικόνα 2.2	<i>Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος</i>	33
Εικόνα 2.3	<i>Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης</i>	37
Εικόνα 2.4	<i>Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης</i>	38
Εικόνα 2.5	<i>Φάσμα απορρόφησης 2-Nitro-5-thiobenzoic acid</i>	39
Εικόνα 2.6	<i>Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O</i>	41
Εικόνα 2.7	<i>Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA</i>	46
Εικόνα 2.8	<i>Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου</i>	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

		Σελ.
Πίνακας 1.1	Δραστικές μορφές Οξυγόνου (ROS)	14
Πίνακας 1.2	Δραστικές μορφές Αζώτου (RNS)	15
Πίνακας 2.1	Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων	34
Πίνακας 2.2	Σύσταση σιτηρεσίου κοτόπουλων	34
Πίνακας 2.3	Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων	35
Πίνακας 2.4	Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή	35
Πίνακας 2.5	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH	39
Πίνακας 2.6	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη μέτρηση του ρυθμού διάσπασης του H ₂ O ₂	42
Πίνακας 2.7	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC	44
Πίνακας 3.1	Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/mg protein)	52
Πίνακας 3.2	Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control	52
Πίνακας 3.3	Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control	52
Πίνακας 3.4	Αποτελέσματα μετρήσεων του ρυθμού διάσπασης του H ₂ O ₂ (U/mg protein)	54
Πίνακας 3.5	Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control	54
Πίνακας 3.6	Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control	54
Πίνακας 3.7	Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B	55
Πίνακας 3.8	Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B	55
Πίνακας 3.9	Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/mg protein)	56
Πίνακας 3.10	Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control	56
Πίνακας 3.11	Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control	56
Πίνακας 3.12	Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B	57
Πίνακας 3.13	Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B	57
Πίνακας 3.14	Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol/mg protein)	58

Πίνακας 3.15	<i>Μείωση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control</i>	58
Πίνακας 3.16	<i>Μείωση % Νεφρικού σε σχέση με Control</i>	58
Πίνακας 3.17	<i>Μείωση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B</i>	59
Πίνακας 3.18	<i>Μείωση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B</i>	59
Πίνακας 3.19	<i>Αποτελέσματα μετρήσεων των Καρβονυλίων (nmol/mg protein)</i>	60
Πίνακας 3.20	<i>Μείωση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control</i>	60
Πίνακας 3.21	<i>Μείωση % Νεφρικού σε σχέση με Control</i>	60
Πίνακας 3.22	<i>Μείωση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B</i>	61
Πίνακας 3.23	<i>Μείωση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B</i>	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

		Σελ.
Γράφημα 3.1	<i>GSH στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.</i>	52
Γράφημα 3.2	<i>Ρυθμός Διάσπασης του H₂O₂ στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.</i>	54
Γράφημα 3.3	<i>TAC στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.</i>	56
Γράφημα 3.4	<i>TBARS στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.</i>	58
Γράφημα 3.5	<i>Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.</i>	60

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

1.1.1. Ελεύθερες ρίζες

Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας των ατόμων και των μορίων βρίσκονται συνήθως σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε μια καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται αντίστοιχα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, που φέρουν στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Γενικά οι ελεύθερες ρίζες παρουσιάζουν αστάθεια και μεγάλη χημική δραστικότητα, η οποία οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους (Valavanidis, 2006). Το μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο της ρίζας αυξάνει τη δραστικότητα του μορίου ή του ατόμου της, διότι προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά άτομα, προκειμένου να σχηματίσει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που θα κάνει τη δομή του σταθερότερη. Σε αυτή τους τη μεγάλη χημική δραστικότητα αποδίδεται και το γεγονός πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του εκάστοτε βιολογικού υποστρώματος. Σε περίπτωση που το βιολογικό υπόστρωμα είναι το DNA τότε είναι δυνατόν να προκληθούν μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν και μεταξύ τους, οδηγώντας στην παραγωγή μιας χημικής ένωσης, η οποία δεν είναι ρίζα. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Άρα, σύμφωνα με τα παραπάνω ως **ελεύθερη ρίζα** (free radical), ορίζεται κάθε είδος ατόμου (όπως οξυγόνο ή άζωτο), μορίου ή ιόντος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα, το οποίο είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge, 1990)(Gilbert, 2000).

1.1.2 Τύποι ελευθέρων ριζών

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα του ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο.

Στο εσωτερικό των κυττάρων οι συνηθέστερες ρίζες είναι οι **δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)**. Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό άτομο το οξυγόνο, στις οποίες συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$) και υπεροξειδίου ($\text{RO}_2\cdot$), καθώς επίσης και τα ανιόντα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-2}$). Οι ROS παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων. Επίσης, ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman & Slater, 1993). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$)	Υποχλωριώδες Οξύ (HOCl)
Ρίζα Υπεροξειδίου ($\text{RO}_2\cdot$)	Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ($\text{HO}_2\cdot$)	Μονήρες Οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

Πίνακας 1.1 Δραστικές μορφές Οξυγόνου (ROS)

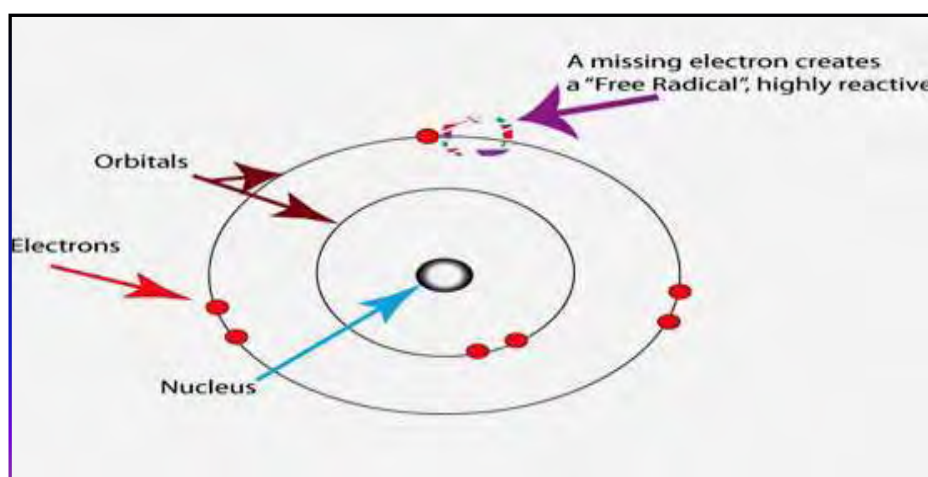
Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν επίσης και οι **δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)**. Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξείδιο του αζώτου $\text{NO}\cdot$ και το διοξείδιο του αζώτου $\text{NO}_2\cdot$, καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν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

2002). Συνηθέστερα εμφανιζόμενη στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον από τις παραπάνω είναι η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$), η οποία παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη και είναι πολύ δραστική. Επιπρόσθετα, έχει μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς χρησιμεύει στη μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων, συμμετέχει στην αγγειοσυστολή και είναι νευροδιαβιβαστής (Halliwell & Gutteridge, 2007).

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

Πίνακας 1.2 Δραστικές μορφές Αζώτου (RNS)

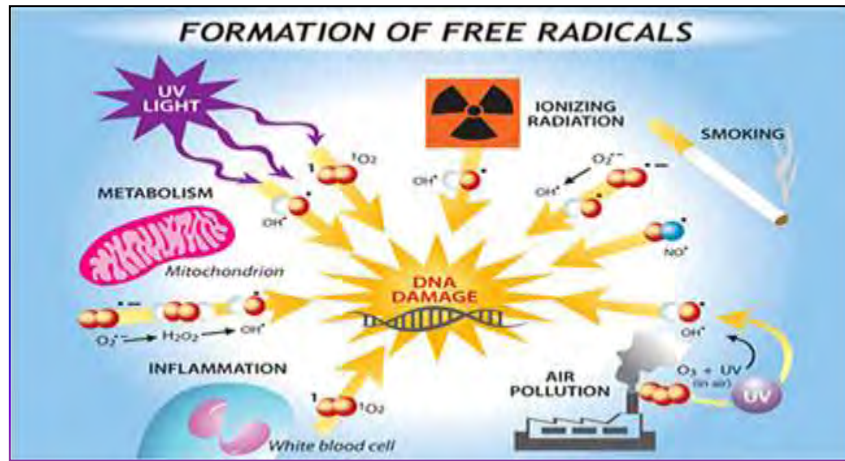
Τέλος, ελεύθερες ρίζες αποτελούν και οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010), καθώς και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο.



Εικόνα 1.1. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ρίζα

1.1.3. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell, 2001).



Εικόνα 1.2 Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

1.1.3.1. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται από ενδογενείς βιοχημικές διεργασίες ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού μεταβολισμού των κυττάρων. Κυριότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελεί το οξυγόνο.

i) Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς. Λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Κατά τη διεργασία αυτή παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή/ και το FADH₂ προς το O₂ δια μέσου μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Τα μόρια NADH και FADH₂ που σχηματίζονται από τη γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξείδωση λιπαρών οξέων, είναι μόρια που φέρουν ένα ζευγάρι ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Η ροή των ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ στο οξυγόνο γίνεται μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, τα οποία καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου σε

νερό. Τα πρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-ουβικινόνης, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης-κυτοχρώματος c και η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot -}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot -}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Το $O_2^{\cdot -}$ μπορεί να αντιδράσει με το H_2O_2 προς παραγωγή OH^{\cdot} , αντίδραση που καλείται “Haber-Weiss”:



Συνεπώς, κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών με τη μορφή ROS ως παραπροϊόντων, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα).

ii) Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450

Τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους. Αναλυτικότερα, τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε αντιδράσεις της φάσης I, αλλά και γενικότερα στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών προς τον οργανισμό ουσιών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο O_2 και οξειδώνοντας το υπόστρωμα (δηλαδή το ξενοβιοτικό) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



* με RH συμβολίζεται η ξενοβιοτική ουσία.

Στην πραγματικότητα και το ξενοβιοτικό και τα NADH ή NADPH οξειδώνονται ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε νερό (H_2O). Έτσι το ενζυμικό αυτό σύστημα λέγεται και οξειδάση μικτού τύπου. Τα ένζυμα του συστήματος P450 είναι αιμοπρωτεΐνες και εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση και απομάκρυνση των ξενοβιοτικών από τον οργανισμό, αλλά μπορεί να οδηγήσουν και στη μετατροπή τους σε τοξικές και καρκινογόνες ενώσεις.

iii) Υπεροξειδιοσώματα

Μία ακόμα ενδογενής πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδιοσώματα. Τα μεμβρανικά αυτά κυστίδια διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα όπως είναι η καταλάση, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης με στόχο την καταστροφή διαφόρων επιβλαβών ουσιών για το κύτταρο. Τα υπεροξειδιοσώματα συμμετέχουν, επίσης, στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al., 2010). Τα υπεροξειδιοσώματα αδρανοποιούν το H_2O_2 μετά από μετατροπή του σε νερό.

iv) Ανοσοποιητικό σύστημα- Φλεγμονή

Ιστική βλάβη που μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες (π.χ. παθογόνα που διαπερνούν τους εξωτερικούς φραγμούς της έμφυτης ανοσίας), είναι δυνατόν να επάγει μια ακολουθία φαινομένων, που είναι γνωστή ως φλεγμονώδης απόκριση. Η διαδικασία αυτή αποτελεί έναν από τους βασικότερους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού. Η οξεία φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να καταπολεμήσει μια μόλυνση σε πρώιμο στάδιο και να πυροδοτήσει διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα την επιδιόρθωση των ιστικών βλαβών που έχουν προκύψει. Κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών, όπως H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Klebanoff et al., 1988).

v) Ιόντα μετάλλων

Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), τα οποία αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι

πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, δρώντας έτσι ως ελεύθερες ρίζες και προκαλώντας καταστροφικές μεταβολές στα μόρια αυτά.

1.1.3.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Δημιουργία ελευθέρων ριζών μπορεί να προκληθεί και από εξωγενείς παράγοντες, μερικοί από τους οποίους είναι οι εξής:

- έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία
- αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ
- διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του κυτοχρώματος P450.
- επίδραση βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός)
- αέρια του νέφους της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων
- ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξείδιο του άνθρακα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.1.4 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν διπλό ρόλο στον οργανισμό, ακολουθώντας το φαινόμενο της όρμησης (hormesis). Κατά το φαινόμενο αυτό, χαμηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών επιδρούν ευεργετικά στον οργανισμό διότι είναι απαραίτητες για ορισμένες θεμελιώδεις διεργασίες των κυττάρων. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις τους υπερβαίνουν τις φυσιολογικές τιμές, σε βαθμό που δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οδηγούν σε πρόκληση βλαβών σε βιομόρια.

1.1.4.1 Φυσιολογικοί ρόλοι Ελευθέρων Ριζών

Αν και οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται παραδοσιακά επιβλαβή παραπροϊόντα του αερόβιου κυτταρικού μεταβολισμού, αυτή η άποψη έχει αλλάξει και είναι πλέον προφανές ότι η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και δραστικών μορφών αζώτου (RNS) σχετίζονται δυναμικά με διαδικασίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στις περισσότερες περιπτώσεις κυτταρικής σηματοδότησης. Κατά τη διάρκεια φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών διαδικασιών, οι ROS και RNS μπορούν να δράσουν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι και να συμμετάσχουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Είναι ρυθμιστές της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, συμμετέχοντας στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και ενεργοποιώντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Έχουν ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και στη χημειοταξία. Συμμετέχουν επίσης σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση ενζύμων. Αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, ενεργοποιώντας προστατευτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Τέλος, η ρίζα NO είναι σημαντικός ρυθμιστής της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυϊκών ιστών. (István Bókkon, 2012)

1.1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών – Οξειδωτικό στρες

Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μια διαταραχή στην ισορροπία προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage). Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (Sies, 1991). Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004). Η κατάσταση αυτή καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών

αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- i. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, είτε λόγω εξάντλησης των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- ii. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS, RNS). Αυτό συμβαίνει λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή τους.

Αρνητικές επιπτώσεις Οξειδωτικού Στρες

Σε αυξημένες τιμές οι ελεύθερες ρίζες έχουν αρνητικές επιδράσεις, καθώς είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA προκαλώντας αλλοίωση ή καταστροφή τους. Αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι και ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης παθήσεων όπως ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές νόσοι (Alzheimer, Parkinson) και γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001). Παράλληλα, το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).

➤ Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι τα πλέον ευαίσθητα βιομόρια στην οξειδωτική καταστροφή. Το οξειδωτικό περιβάλλον που δημιουργείται στο κύτταρο ως αποτέλεσμα της παρουσίας ελευθέρων ριζών, οδηγεί στο σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως λιπιδική υπεροξειδωση και τα ασταθή προϊόντα της διασπώνται με αποτέλεσμα να προκύψουν ρίζες περοξυλίου $\text{ROO}\cdot$, συζυγή διένια και μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, η καταστροφή των PUFA οδηγεί σε

αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας των μεμβρανών με συχνό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneany, 2001).

➤ Πρωτεΐνες

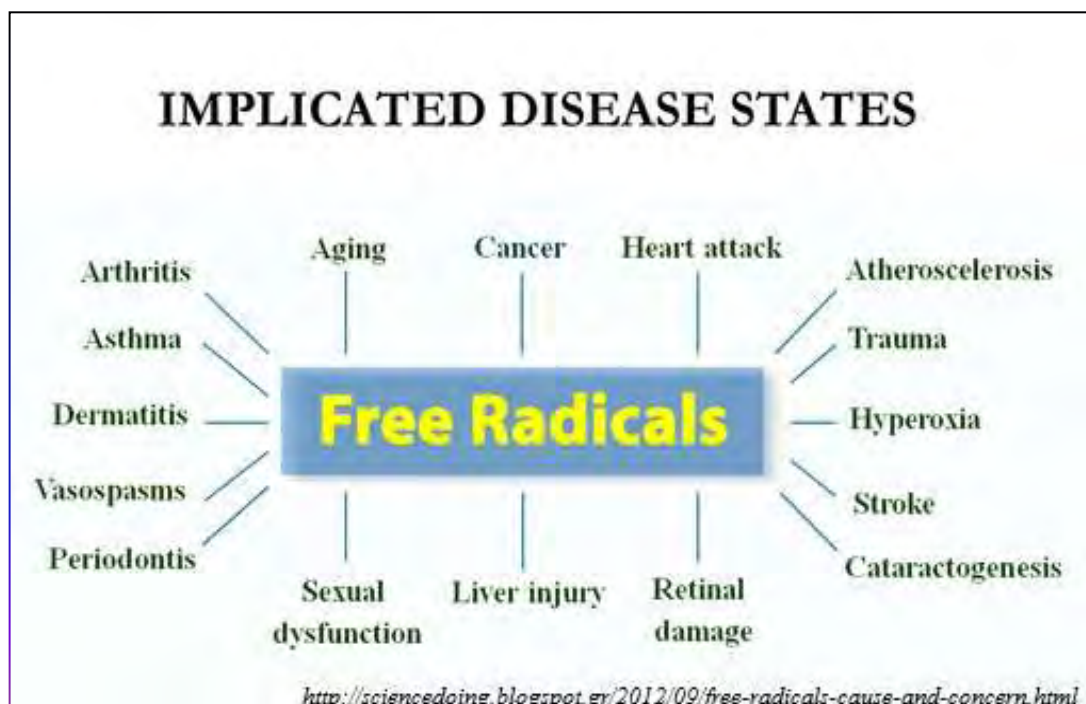
Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH[·], το RO[·] και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες με άμεση και έμμεση καταστροφή από τις ROS υφίστανται αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και τελικά καταστροφή. Οι επιπτώσεις αυτής της καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες, όπως παραγωγή ενέργειας, και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

➤ DNA

Παρόλο που το DNA είναι σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η τροποποίηση στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Τελικό αποτέλεσμα είναι η πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση και γήρανση (Radak et al., 1999). Επιπλέον, ρίζες υδροξυλίου (OH[·]) και περοξυλίου (ROO[·]) μπορούν να προκαλέσουν μονόκλωνες ρίζεις σε πλασμιδιακό DNA.

Παράλληλα με τα προαναφερθέντα βιομόρια, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση. Σε περίπτωση που οι αλλοιώσεις είτε στα βιομόρια είτε στη σηματοδότηση είναι εκτεταμένες προκαλείται κυτταρικός θάνατος μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης. Στη νέκρωση, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα, ενώ στην απόπτωση τα

κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.



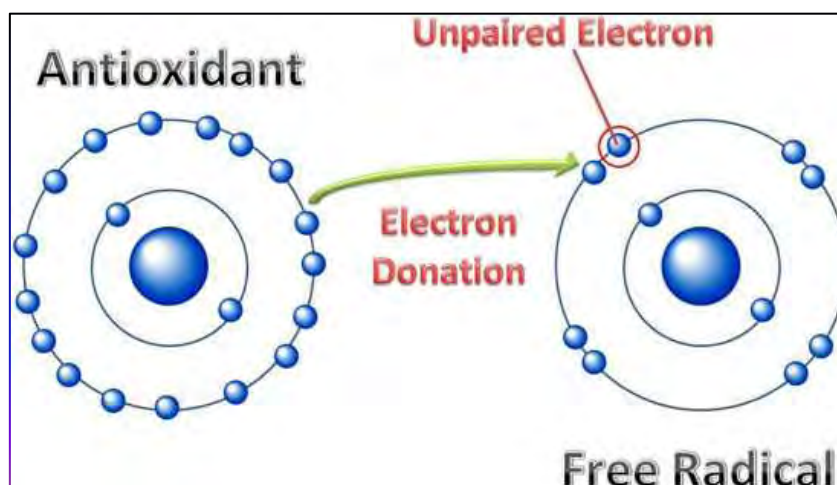
Εικόνα 1.3 Ασθένειες που προκαλούνται λόγω των ελευθέρων ριζών

1.1.5. Αντιοξειδωτική Άμυνα - Αντιοξειδωτικές Ουσίες

Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ROS και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες. Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001; Krinsky, 2002). Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Γιαννακοπούλου, 2009). Βασική προϋπόθεση για να δρα ένα μόριο αντιοξειδωτικά είναι αφενός να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου να σχηματίζει σχετικά αδρανή και λιγότερο δραστικά προϊόντα από τις ρίζες που αδρανοποιεί.

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- Παρεμποδίζουν τη δημιουργία ROS
- Σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.
- Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
- Δρουν συνεργειακά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (π.χ Βιταμίνη C) συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού (τοκοφερόλη). Στην περίπτωση αυτή λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 1.4 Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας

1.1.5.1 Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

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

Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, δηλαδή τα αντιοξειδωτικά που παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η

καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται σε διάφορα μέρη μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται σε διάφορα τμήματα όπως στις μεμβράνες και το κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgoulianis 2006).

Εξωγενή Αντιοξειδωτικά

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

1.2 Πολυφαινόλες

1.2.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα

φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού, λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων καθώς και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006).

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Συναντώνται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμα και ολιγοσακχαρίτης. Ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια (Bravo L., et al., 1998). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

➤ **Φλαβονοειδή**

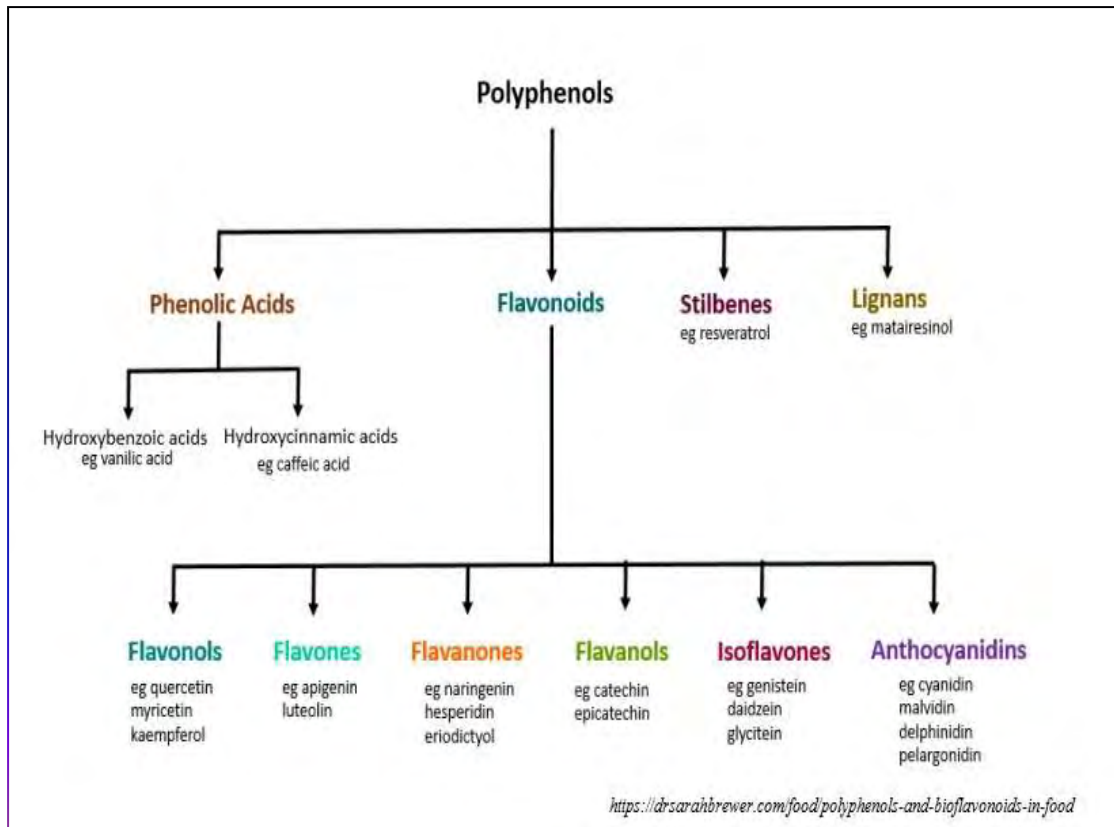
Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες:

- Φλαβονόλες
- Φλαβανόλες
- Φλαβόνες
- Φλαβανόνες
- Ισοφλαβόνες
- Ανθοκυανιδίνες

➤ Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε 3 υποκατηγορίες:

- *Φαινολικά οξέα*. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικρκικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.
- *Λιγνάνες*. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, και ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma K., et al., 2007).
- *Στιλβένια*. Με την πιο διάσημη από αυτά την Ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.



Εικόνα 1.5 Κατηγορίες Πολυφαινολών

1.2.2. Ιδιότητες πολυφαινολών

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al., 2005). Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M., Dong Z., 2006).

1.2.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

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

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

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

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

προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αναλόγως λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών του επιδράσεων.

1.3 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσθήκη σκόνης πολυφαινολικών προσθέτων στο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο νεφρικό ιστό και στον ιστό τετρακεφάλου, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν υπάρχει ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ / Θεσσαλίας:

- Εκτροφή κοτόπουλων (Ημερήσια διάλυση πολυφαινολικής σκόνης στο νερό και παρακολούθηση συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).
- Παρακολούθηση ανάπτυξης κοτόπουλων (Μέτρηση αύξησης ζωικού βάρους κάθε πέντε (5) μέρες).

Στο πτηνοσφαγείο:

- Ιστοληψία

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:

- Ταχεία και ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων και τοποθέτησή τους σε ψυγείο στους -80°C.
- Επεξεργασία των δειγμάτων (ομογενοποίηση- φυγοκέντρηση- συλλογή υπερκειμένου).
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

2.2 Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος

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



Εικόνα 2.1 Προϊόντα πολυφαινολικού εχυλίσματος

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

Το προϊόν παράγεται σε υγρή μορφή η οποία είναι σταθερή και ασφαλής χωρίς ανάγκη οποιασδήποτε προσθήκης συντηρητικού. Η μετατροπή του σε μορφή σκόνης, γίνεται με χρήση **αντιεκρηκτικής τεχνολογίας συσκευής ξήρανσης με ψεκασμό (Spray Dryer)**.

Περιγραφή προϊόντος

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

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

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

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

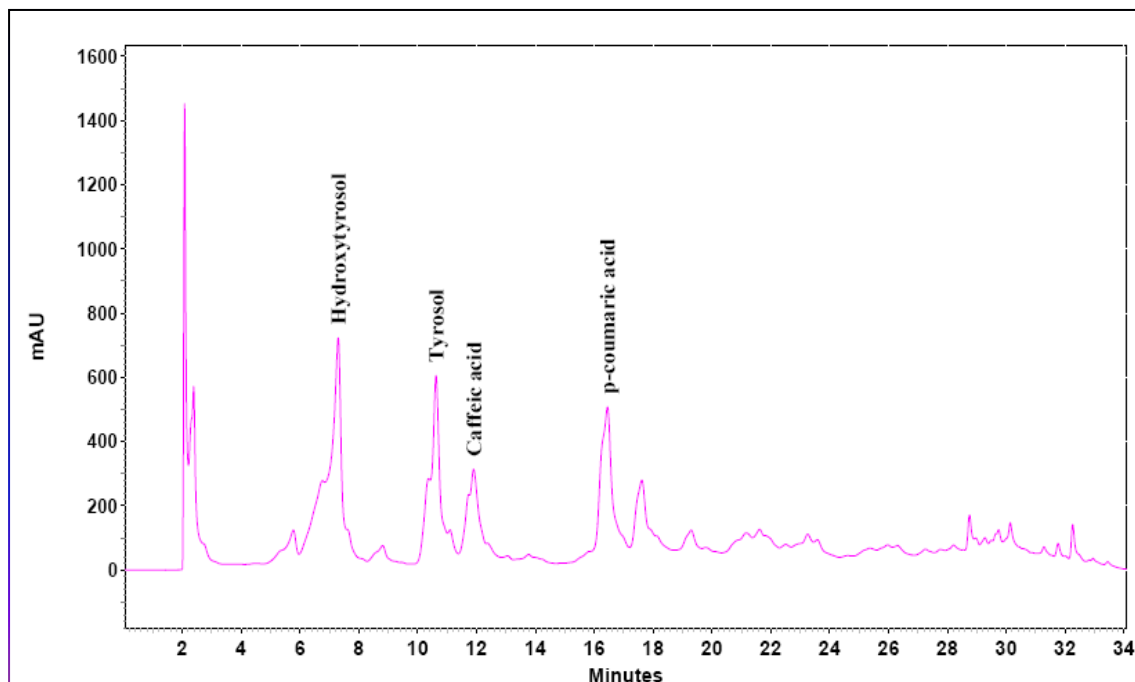
Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

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

Χημική σύσταση

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

- A) Υδροξυτυροσόλη
- B) Τυροσόλη
- Γ) Καφεϊκό οξύ
- Δ) p-κουμαρικό οξύ
- E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες



Εικόνα 2.2 Χρωματογραφία HPLC του πολυφαινολικού προφίλ του προϊόντος

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο 75 κοτόπουλα

κρεατοπαραγωγής, υβρίδια F1 SASSO / HUBBARD από την εκτροφή του αγροκτήματος του ΤΕΙ / Θεσσαλίας. Αυτά χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 25 ατόμων ως εξής:

Ομάδα	Συγκέντρωση πολυφαινολικής σκόνης	Ποσότητα πολυφαινολικής σκόνης / 10 L H ₂ O
1η	Control	-
2η	200ppm	2gr
3η	500ppm	5gr

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων

2.3. Περιγραφή Σιτηρεσίου – Βάρη

Και οι τρεις (3) ομάδες λάμβαναν τροφή, η οποία ανανεωνόταν καθημερινά, όπως και το νερό που τους τροφοδοτούνταν.

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

Πίνακας 2.2 Σύσταση σιτηρεσίου κοτόπουλων

*Μορφή: αλευρώδης

Τα κοτόπουλα και των τριών (3) ομάδων ζυγίζονταν κάθε πέντε (5) μέρες, ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί η καμπύλη αύξησης βάρους, καθώς και η απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή των κοτόπουλων.

		ΚΙΛΑ ΟΜΑΔΩΝ		
ΗΛΙΚΙΑ (ΗΜΕΡΕΣ)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	CONTROL	200 ppm	500 ppm
15	20-Sep	7,5	8	8,5
20	26-Sep	11,8	12,4	13,6
25	30-Sep	16	16,8	18,9
30	05-Oct	21,4	22	25
35	10-Oct	24,1	26,5	29,4
40	13-Oct	26,2	30,3	33,9
45	18-Oct	31	36,8	38,6
50	24 -Οκτ	40,2	45,7	49,7
55	29-Oct	44,4	48,5	53,4
60	02-Nov	50,3	54,9	57,8
Σφάγιο Βάρος				
60	02-Nov	40,4	47,1	50,0

Πίνακας 2.3 Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων

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

Απόδοση σε κρέας %		
CONTROL	200ppm	500ppm
80,3	85,8	86,5

Πίνακας 2.4 Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή.

2.4 Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση

2.4.1 Ιστοληψία και μεταφορά στο εργαστήριο

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

2.4.2 Ομογενοποίηση

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν (με αναλογία 1 μέρος ιστού σε 2 μέρη PBS), σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCl και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.(15.000 g - 5 min - 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε σε eppendorfs και φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι να πραγματοποιήσουμε τη βιοχημική ανάλυσή του.

2.5 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στους Ιστούς

2.5.1 Γενικά

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

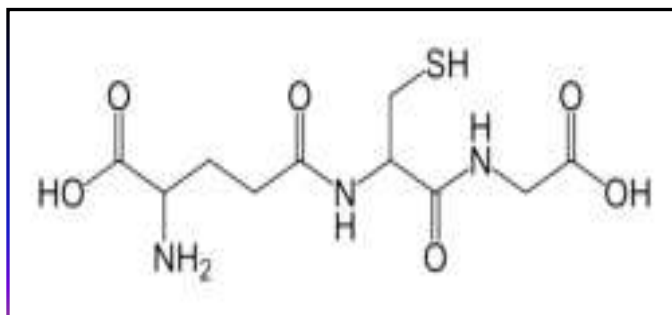
2.5.2 Μέθοδοι

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

2.5.2.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά

μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastoreet al. 2003).



Εικόνα 2.3 Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

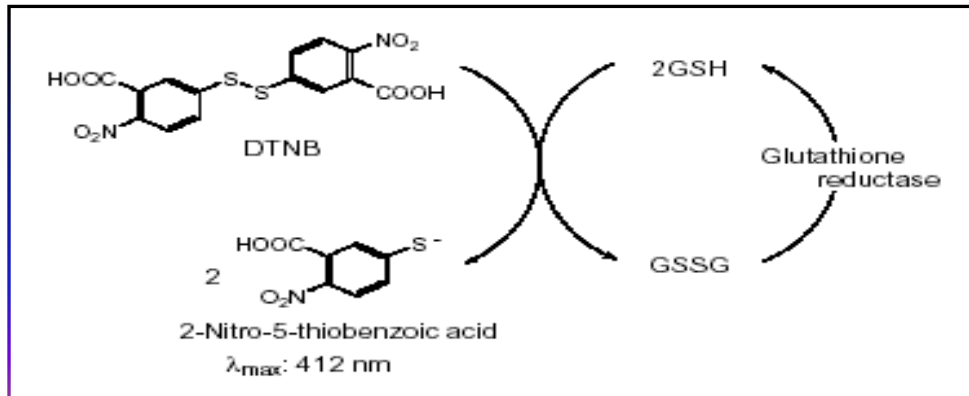
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm. (Reddy, et.al. 2004).



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



Εικόνα 2.4 Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 8). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphatebuffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH ή HCl, 1 N για pH 8.

DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodiumcitrate) σε νερό. (39.6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

Κιτρικό Νάτριο. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδροτρινάτριο, tri-sodiumdihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

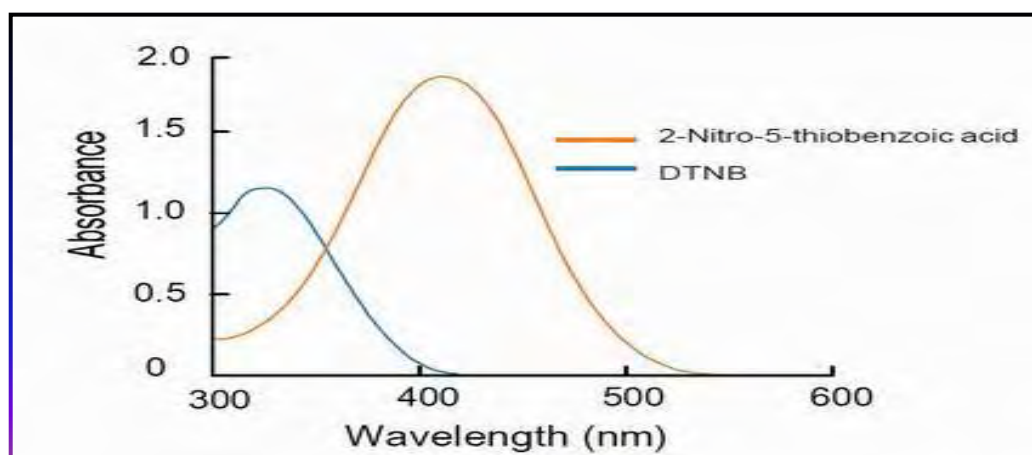
100 μL ιστού προστέθηκαν σε 100 μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C . Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67 mM (pH 8.0) και 330 μL DTNB.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

Πίνακας 2.5 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH

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



Εικόνα 2.5 Φάσμα απορρόφησης του 2- Nitro-5-thiobenzoic οξέος (DojindoMolecularTechnologies).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μ mol/mg_{total prot.}) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta abs_{\text{τυφλού}}/13.6) \times 2 \times 3$
(λόγω αραιώσεων) $\times 50.5$ / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μ L) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (20 μ L)

($1010/20=50.5$), πολλαπλασιάζουμε με 2 (αραίωση που έγινε από το TCA 5%) και πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, όπου ο άξονας $y = \text{Abs}$ στα 595 nm και ο $x = \text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)}$. Κατόπιν, με τη μέθοδο Bradford, λάβαμε την τιμή της απορρόφησης και υπολογίστηκε αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

2.5.2.2 Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H_2O_2

Αρχή της μεθόδου

Η αποσύνθεση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 οφείλεται εκτός της καταλάσης (Halliwell et al., 2000) και σε ένζυμα όπως: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι υπεροξειδιοξίνες.

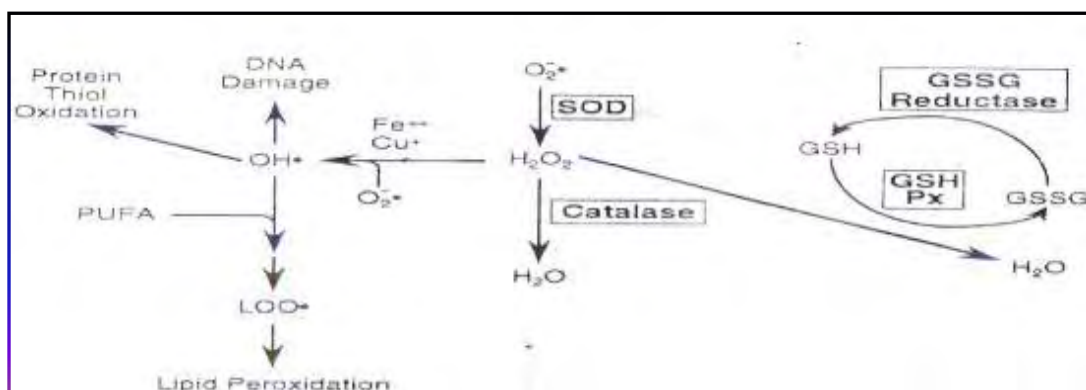
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδιο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλη, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. (Chelikani P, et. al., 2004). 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 τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. (Boon EM, et. al. 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 2.6 Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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



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

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί

προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

Πίνακας 2.6 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση του ρυθμού διάσπασης του H₂O₂

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

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mgHb) = $(\Delta Abs_{\text{sample}} \text{permin} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \times 3) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του

κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) ($3000/40=75$). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Πολλαπλασιάζουμε πάλι με 3, για να συνυπολογίσουμε την νέα αραίωση που έγινε στην μέθοδο.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. $\Delta Abs = \eta$ μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

2.5.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

Αρχή της μεθόδου

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

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4). MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178.

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

DPPH 0.1 mM. MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

Πίνακας 2.7 Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

- i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό,
πχ, % Abs μείωση = $(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$
- ii) $\text{Mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5] / 1000.$

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 40 μL ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

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

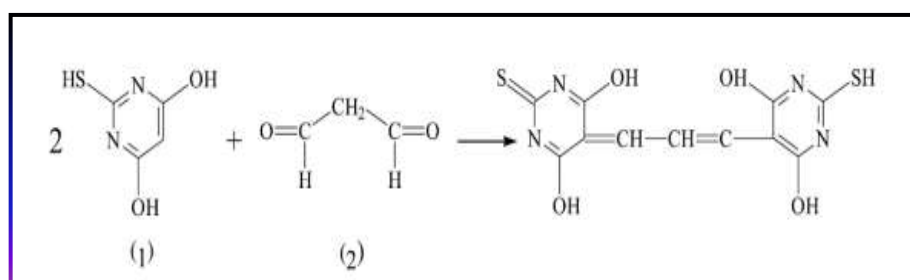
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

2.5.2.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

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



Εικόνα 2.7 Αντίδραση TBA(1) με MDA(2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA

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

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4). MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL

του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxy-methylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM). MB (TBA): 144.1 και MB (Na₂SO₄): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται πάντα την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95°C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε erpendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}) / 0.156 \times 31$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3.100 / 100 = 31$). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156.000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

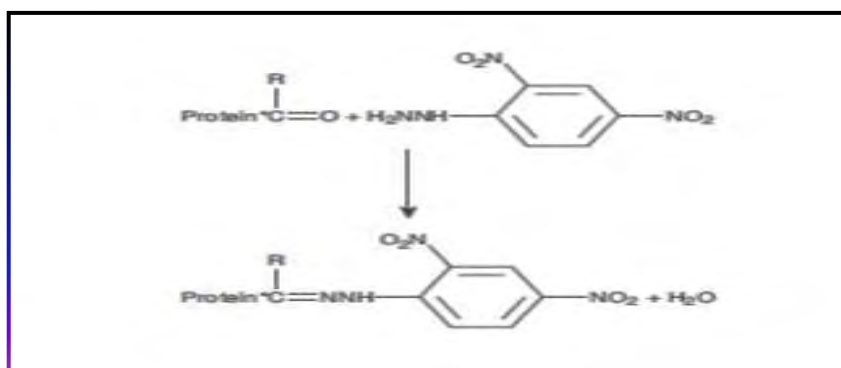
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

2.5.2.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $-C = O$, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της αργινίνης (Arg), της λυσίνης (Lys) και της θρεονίνης (Thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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



Εικόνα 2.8 Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δινιτροφαιλυδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαιλυδραζονίου

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών επηρεάζει όχι μόνο τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που διορθώνουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).

Αντιδραστήρια

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

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

DNPH 14 mM. (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

Ουρία 5 M (pH 2.3). (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Σε 50 μl ιστού προσθέτουμε 50 μl 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του ιστού. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ)

χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

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

Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα 0.5 mL του 14 Mm DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επιδιώκουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επιδιώκουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000 / 50 \times 3 \times 2 \times 3 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για

να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά, και μετά ξανά με 3 λόγω της αραιώσης στην αρχή της μεθόδου.

2.5.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

2.6 Στατιστική ανάλυση

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

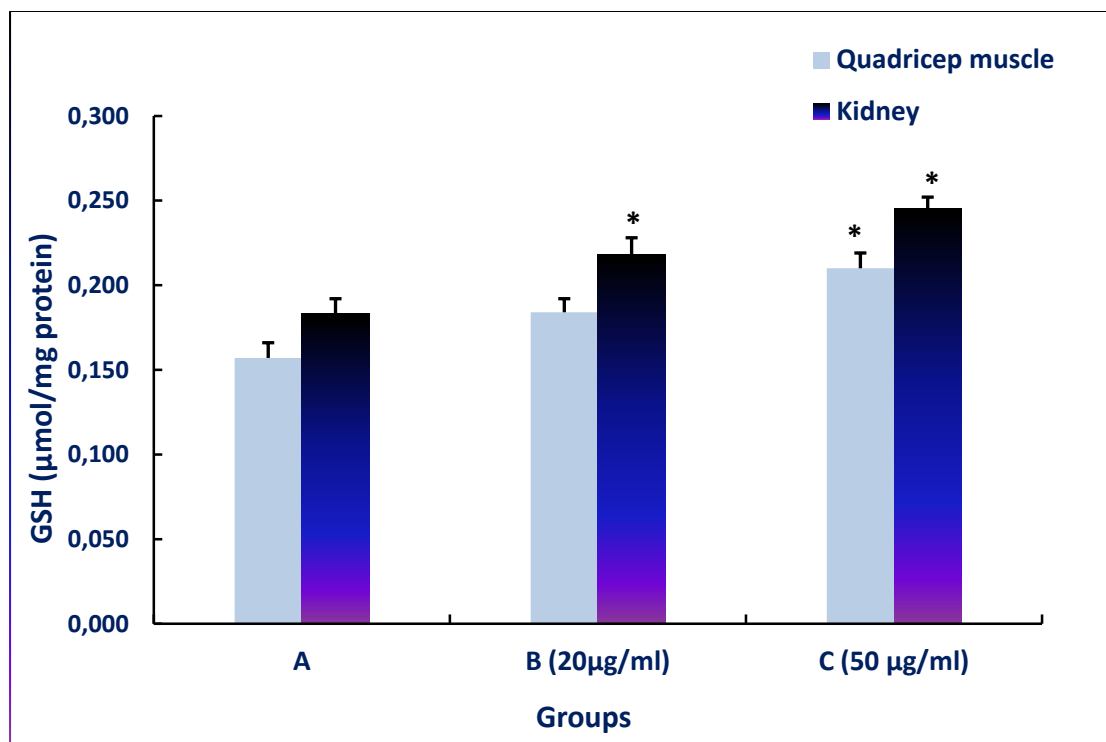
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω των τεστ των Tukey και Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC.
- Η μεταβολή της δραστηριότητας της CAT.
- Η μεταβολή της συγκέντρωσης της GSH.
- Η μεταβολή του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS.
- Η μεταβολή του δείκτη των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH)



Γράφημα 3.1 GSH στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control
 # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

GSH ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ			GSH ΝΕΦΡΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	0,157	0,009	A	0,183	0,009
B (20 μg/ml)	0,184	0,008	B	0,218	0,010
C (50 μg/ml)	0,210	0,009	C	0,245	0,007

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/mg protein)

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
B	17,20
C	33,76

Πίνακας 3.2 Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control

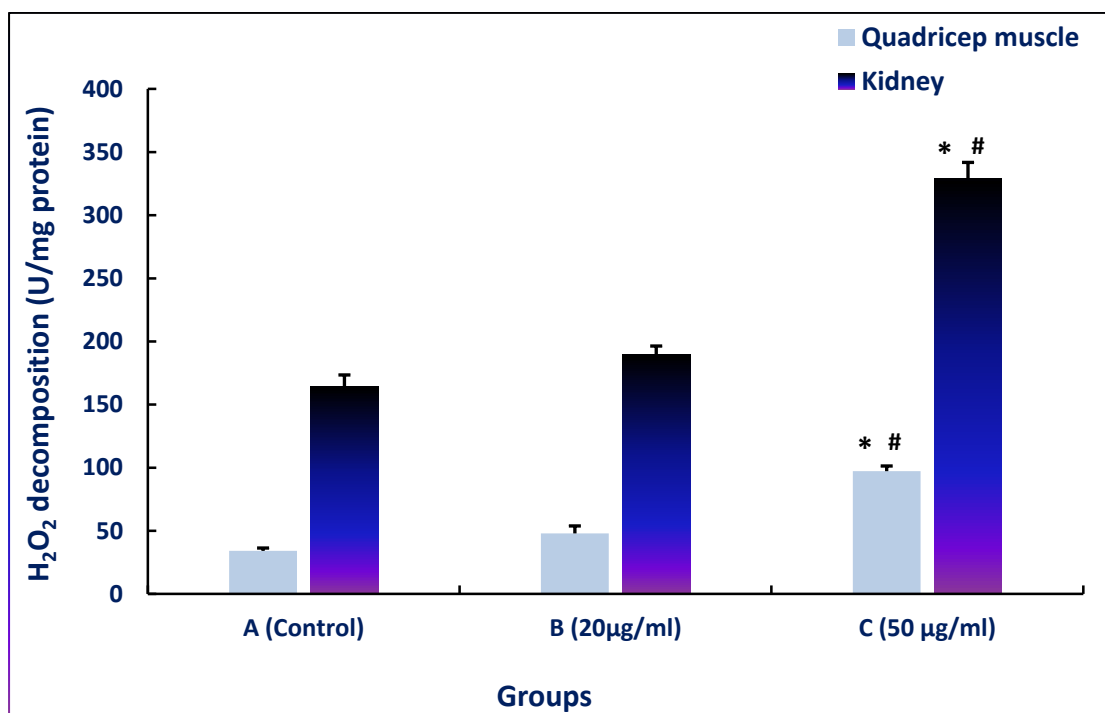
	Νεφρικός 45 d. treatment
B	19,13
C	33,88

Πίνακας 3.3 Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control

Παρατηρήσεις:

- Τετρακέφαλος: Παρατηρούμε ότι η ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH) είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στην ομάδα C (50μg/ml) σε σχέση με την ομάδα Control (αύξηση κατά 33,76%). Στην ομάδα B(20μg/ml) δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη σε σχέση με την ομάδα Control (17,20%).
- Νεφρικός: Η GSH είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη τόσο στην ομάδα B(20μg/ml), όσο και στην ομάδα C(50μg/ml), σε σχέση με την ομάδα Control (αύξηση κατά 19,13% και 33,88% αντίστοιχα).
- Μεταξύ των τιμών των ομάδων B και C δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή σε κανένα από τα δύο είδη ιστών.

3.2 Ρυθμός Διάσπασης του H₂O₂



Γράφημα 3.2. Ρυθμός διάσπασης του H₂O₂ στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control
 # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ			ΝΕΦΡΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	34,1	2,3	A	164,4	9,1
B (20µg/ml)	48,0	5,9	B	189,8	6,6
C (50 µg/ml)	97,3	4,1	C	328,9	12,9

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα μετρήσεων του Ρυθμού Διάσπασης του H₂O₂ (U/mg protein)

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
B	14,18
C	185,34

Πίνακας 3.5 Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control

	Νεφρικός 45 d. treatment
B	15,45
C	100,06

Πίνακας 3.6 Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
C	102,70

Πίνακας 3.7 Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B

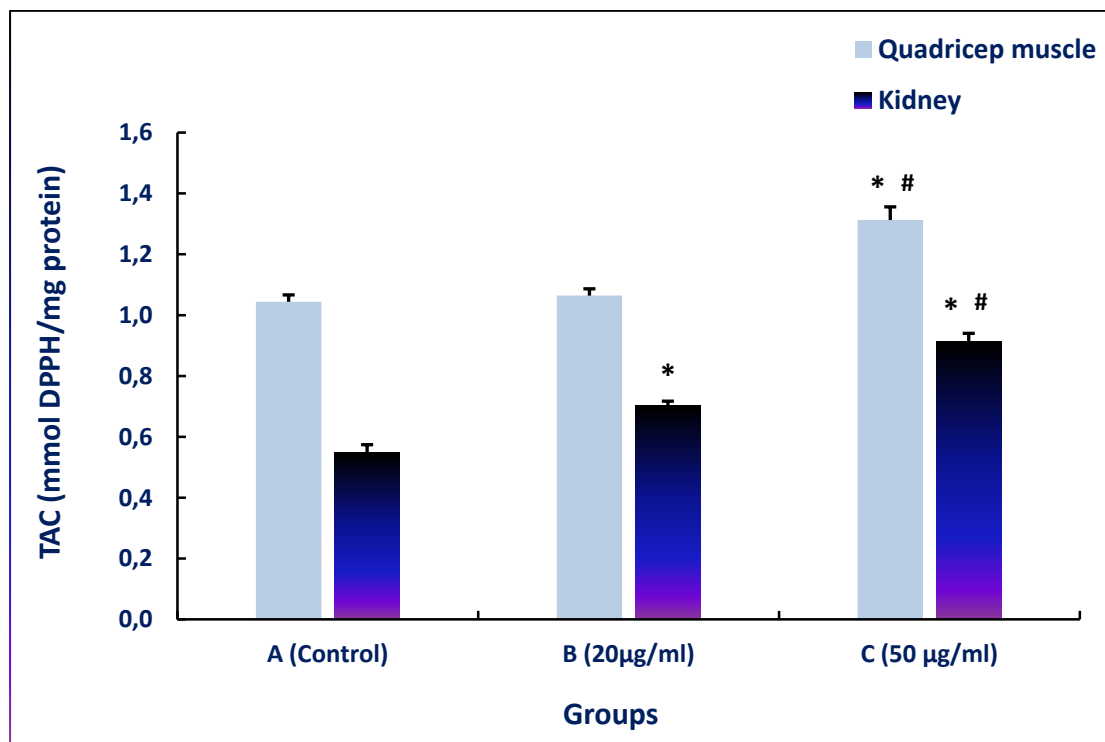
	Νεφρικός 45 d. treatment
C	73,29

Πίνακας 3.8 Αύξηση % ομάδας C σε σχέση με ομάδα B

Παρατηρήσεις:

- Τετρακέφαλος: Ο ρυθμός διάσπασης του H₂O₂ παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control (185,34%). Αντίθετα, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των τιμών μεταξύ της ομάδας B και της ομάδας Control. Παράλληλα, οι τιμές της ομάδας C παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τις τιμές της ομάδας B (αύξηση κατά 102,70%).
- Νεφρικός: Ο ρυθμός διάσπασης του H₂O₂ παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control (αύξηση κατά 100,06%). Παρόμοια στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρείται μεταξύ των τιμών της ομάδας B και της ομάδας Control. Παράλληλα, στατιστικά σημαντική είναι η αύξηση των τιμών της ομάδας C σε σχέση με τις τιμές της ομάδας B (73,29%).

3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)



Γράφημα 3.3 TAC στον Τετρακέφαλο και στο Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control
 # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ			ΝΕΦΡΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	1,044	0,023	A	0,548	0,027
B (20 µg/ml)	1,064	0,022	B	0,704	0,013
C (50 µg/ml)	1,313	0,043	C	0,914	0,026

Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmolDPPH/mg protein)

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
B	1,92
C	25,77

Πίνακας 3.10 Αύξηση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control.

	Νεφρικός 45 d. treatment
B	28,47
C	66,79

Πίνακας 3.11 Αύξηση % Νεφρικού σε σχέση με Control.

Τετρακέφαλος 45 d. treatment	
C	23,40

Πίνακας 3.12 Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

Νεφρικός 45 d. treatment	
C	29,83

Πίνακας 3.13 Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

Παρατηρήσεις:

Το παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζει τα mmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά mg συνολικής πρωτεΐνης, για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).

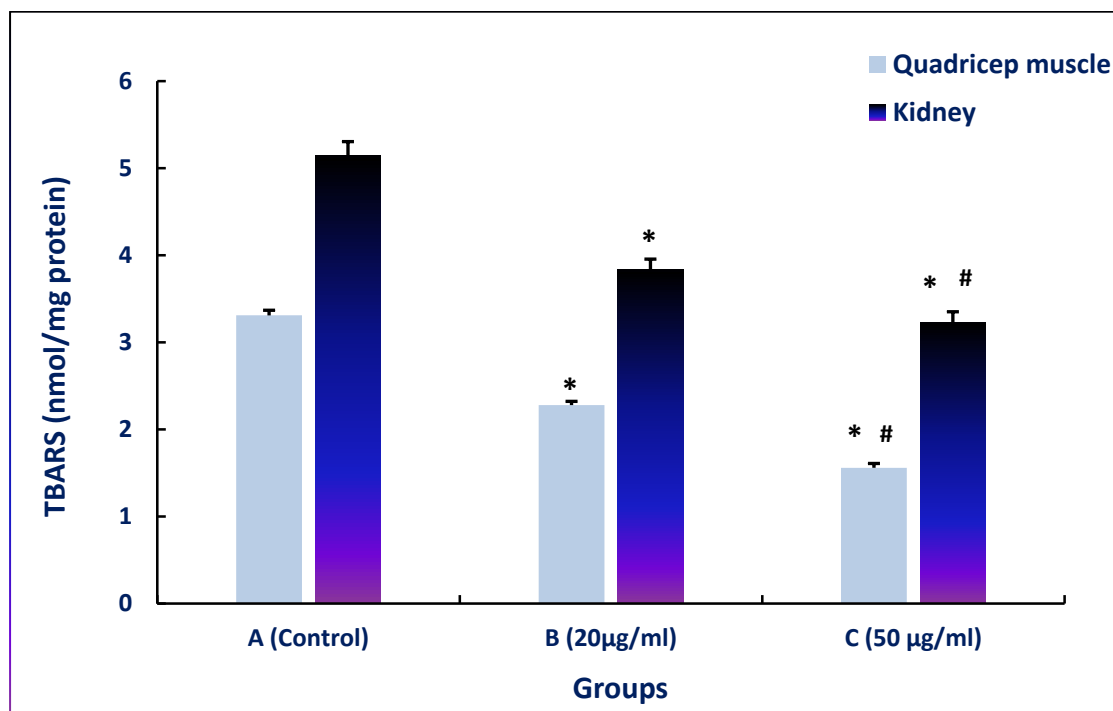
- Τετρακέφαλος: Στα επίπεδα της TAC παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control(25,77%), ενώ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή στις τιμές της ομάδας B σε σχέση με την ομάδα Control.

Παράλληλα, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις τιμές της ομάδας C σε σχέση με την ομάδα B (αύξηση κατά 23,40%).

- Νεφρικός: Τα επίπεδα της TAC παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένα και στην ομάδα B και στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control(28,47% και 66,79% αντίστοιχα).

Στατιστικά σημαντική είναι επίσης η αύξηση της τιμής της TAC στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα B(29,83%).

3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS)



Γράφημα 3.4. TBARS στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control
 # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ			ΝΕΦΡΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	3,31	0,059	A	5,15	0,159
B (20µg/ml)	2,28	0,043	B	3,84	0,122
C (50 µg/ml)	1,56	0,049	C	3,23	0,119

Πίνακας 3.14 Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol/mg protein)

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
B	31,12
C	52,87

Πίνακας 3.15 Μείωση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control.

	Νεφρικός 45 d. treatment
B	25,44
C	37,28

Πίνακας 3.16 Μείωση % Νεφρικού σε σχέση με Control.

Τετρακέφαλος 45 d. treatment	
C	29,98

Πίνακας 3.17 Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

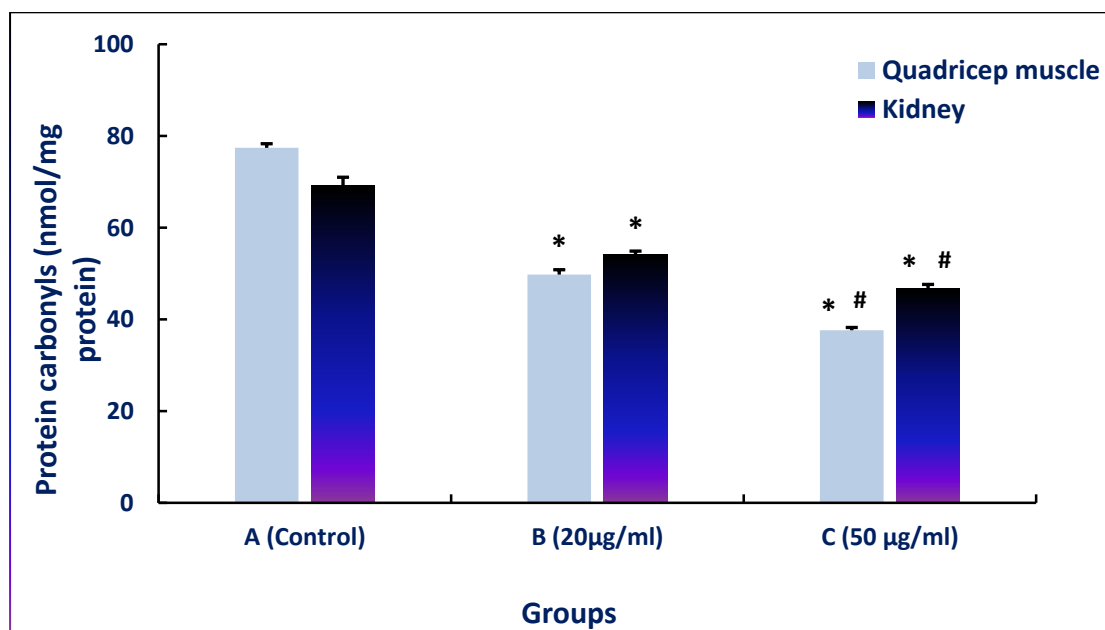
Νεφρικός 45 d. treatment	
C	15,89

Πίνακας 3.18 Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

Παρατηρήσεις:

- Τετρακέφαλος: Οι τιμές των TBARS έχουν μειωθεί στατιστικά σημαντικά και στην ομάδα B και στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control (31,12% και 52,87% αντίστοιχα).
Παράλληλα, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS και στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα B (29,98%).
- Νεφρικός: Παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των TBARS και στις δύο ομάδες B και C σε σχέση με την ομάδα Control (25,44% και 37,28% αντίστοιχα).
Στατιστικά σημαντική είναι και η μείωση των τιμών των TBARS στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα B(15,89%).

3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια



Γράφημα 3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Τετρακέφαλο και Νεφρικό ιστό των κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control
 # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ			ΝΕΦΡΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	77,44	0,895	A	69,14	1,881
B (20µg/ml)	49,79	1,064	B	54,27	0,647
C (50 µg/ml)	37,65	0,601	C	46,65	0,996

Πίνακας 3.19 Αποτελέσματα μετρήσεων των Καρβονυλίων (nmol/mg protein)

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
B	35,71
C	51,38

Πίνακας 3.20 Μείωση % Τετρακεφάλου σε σχέση με Control

	Νεφρικός 45 d. treatment
B	21,51
C	32,53

Πίνακας 3.21 Μείωση % Νεφρικού σε σχέση με Control.

	Τετρακέφαλος 45 d. treatment
C	24,38

Πίνακας 3.22 Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

	Νεφρικός 45 d. treatment
C	14,04

Πίνακας 3.23 Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με ομάδα B.

Παρατηρήσεις:

- Τετρακέφαλος: Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών Καρβονυλίων έχουν μειωθεί στατιστικά σημαντικά και στην ομάδα B και στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα Control (35.71% και 51.38% αντίστοιχα).
Επίσης, παρατηρούμε και στατιστικά σημαντική μεταβολή στις τιμές των Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων της ομάδας C σε σχέση με τις τιμές της ομάδας B (μείωση κατά 24,38%).
- Νεφρικός: Παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στις ομάδες B και C σε σχέση με την ομάδα Control(21,51% και 32,53% αντίστοιχα).
Παράλληλα, οι τιμές των Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση στην ομάδα C σε σχέση με την ομάδα B(14,04%)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση σε αυτά πόσιμου νερού με πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου. Η πολυφαινολική σκόνη που χορηγήθηκε παράγεται από νανοενθυλάκωση με χρήση μαλτοδεξτρίνης, από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: μία ομάδα ελέγχου (control) και δύο που λάμβαναν την σκόνη πολυφαινόλης μέσω του πόσιμου νερού σε συγκεντρώσεις 20 (ομάδα Β) και 50ppm (ομάδα C) αντίστοιχα. Το ακολουθούμενο σιτηρέσιο ήταν το ίδιο για όλες τις ομάδες. Συνολικά πραγματοποιήθηκε ιστοληψία από τριάντα έξι (36) κοτόπουλα, από δώδεκα (12) δηλαδή κοτόπουλα σε κάθε μία από τις τρεις (3) ομάδες.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι μελετήθηκαν ήταν:

- η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH),
- ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 ,
- η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total antioxidant capacity),
- οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances), και
- τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Συγκρίνοντας τις τιμές των παραπάνω δεικτών τόσο μεταξύ των πτηνών της ομάδας Control (κοτόπουλα που δεν λάμβαναν την πολυφαινολική σκόνη) και των πολυφαινολικών ομάδων Β και C (κοτόπουλα που ελάμβαναν πολυφαινολική σκόνη) όσο και μεταξύ των πτηνών των δύο πολυφαινολικών ομάδων, επετεύχθη εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των νεφρικών ιστών και ιστών τετρακεφάλου των υπό μελέτη κοτόπουλων. Οι δείκτες αυτοί μελετήθηκαν, διότι αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς.

- [Ανηγμένη Γλουταθειόνη \(GSH\)](#)

Η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται

από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et al., 1989) (Hughes et al., 1964), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementi et al., 1999). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα, η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται κυρίως από τα ένζυμα S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυμικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης, παρατηρείται ότι στο νεφρικό ιστό, σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο πολυφαινολικές ομάδες. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση κατά 19,13% στην ομάδα των 20 ppm, ενώ στην ομάδα των 50 ppm κατά 33,88%. Στον ιστό τετρακεφάλου, σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μόνο στην ομάδα των 50 ppm, κατά 33,76%. Παράλληλα, σε κανέναν από τους δύο ιστούς δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH στην ομάδα των 50ppm σε σχέση με την ομάδα των 20ppm. Σε άλλη μελέτη που είχε διεξαχθεί από την ερευνητική μας ομάδα είχε δειχθεί ότι η χορήγηση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος από απόβλητα ελαιοτριβείου, είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να παρουσιάσει αύξηση και στο αίμα των πτηνών. (Gerasopoulos et al. 2015). Η αύξηση της GSH στις δύο πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με την ομάδα Control υποδηλώνει ότι ίσως οι φαινολικές ενώσεις της σκόνης που παράγεται από κατάλοιπα ελαιοτριβείου επιδρούν στη αύξηση της έκφρασης ή/και της δράσης των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH. Αυτά τα ένζυμα είναι η λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (GCL), η GSH συνθετάση και η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR) η οποία αναγεννά την GSH από την οξειδωμένη γλουταθειόνη

(GSSG) (Aquilano et al. 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται κυρίως μέσω του στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar et al. 2014). Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πως τα YAE, αυξάνουν την διάσπαση του H_2O_2 , επομένως και την δραστικότητα της καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και στους νεφρούς αρουραίων (Hamden et al., 2009).

- Ρυθμός αποσύνθεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Ο ρυθμός αποσύνθεσης του H_2O_2 σε H_2O και O_2 οφείλεται εκτός της καταλάσης (Halliwell et al., 2000) και σε ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι περοξυρεδοξίνες. Με βάση την αξιολόγηση των μετρήσεων για την διάσπαση του H_2O_2 παρατηρείται ότι, στο νεφρικό ιστό και στον ιστό τετρακεφάλου, η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό έχει αυξήσει στατιστικά σημαντικά τη διάσπασή του στην πολυφαινολικής ομάδα των 50ppm σε σχέση με την ομάδα control, ενώ στην ομάδα των 20ppm δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με το control, στον νεφρικό ιστό τα επίπεδα της διάσπασης υπεροξειδίου στην ομάδα των 50ppm αυξήθηκαν κατά 100,06%. Στον ιστό τετρακεφάλου, σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της διάσπασης στην ομάδα των 50ppm αυξήθηκαν κατά 185,34%. Στατιστικά σημαντική αύξηση υπάρχει και στα επίπεδα διάσπασης του H_2O_2 στην ομάδα των 50ppm σε σχέση με εκείνη των 20ppm. Συγκεκριμένα, η αύξηση αυτή κυμάνθηκε στην τιμή 73,29% στο νεφρικό ιστό και στην τιμή 102,70% στον ιστό τετρακεφάλου. Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πως τα YAE, αυξάνουν την διάσπαση του H_2O_2 και άρα και την δραστικότητα της καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και στους νεφρούς αρουραίων (Hamden et al., 2009). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανήκει στις ROS και προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Η αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησής του σημαίνει και μείωση της δραστικότητάς του με αποτέλεσμα τον περιορισμό των προκαλούμενων βλαβών στον κυτταρικό μηχανισμό.

- **Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)**

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο ένας από αυτούς, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα, είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο. Τα αποτελέσματα που λάβαμε δείχνουν, σε σχέση με την ομάδα Control, στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC στις πολυφαινολικές ομάδες των 50ppm και στους δύο ιστούς, ενώ στις ομάδες των 20ppm στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στο νεφρικό ιστό. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την ομάδα Control, στο νεφρικό ιστό τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 28,47% στην ομάδα των 20ppm, ενώ στην ομάδα των 50ppm αυξήθηκαν κατά 66,79%. Στον ιστό τετρακέφαλου, σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 25,77% στην ομάδα των 50ppm. Στατιστικά σημαντική ήταν και η αύξηση της TAC στην ομάδα C(50ppm) σε σχέση με τη B(20ppm) και στους δύο ιστούς—29,83% στο νεφρικό και 23,40% στον τετρακέφαλο. Αυτή η αύξηση στην TAC οφείλεται εν μέρει στην αύξηση της GSH που προκάλεσε στους δύο ιστούς η χορήγηση του εκχυλίσματος στα κοτόπουλα. Λόγω του ότι η TAC προσδιορίζει τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν τις ROS, η αύξησή της μπορεί να οφείλεται και στο ότι στους ιστούς αυξήθηκαν τα πολυφαινολικά μόρια που περιέχονται στο εκχύλισμα. Σε άλλες μελέτες σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) ήταν αυξημένη στο αίμα των κοτόπουλων που είχαν λάβει την πολυφαινολική σκόνη (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015).

- **Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)**

Η υπεροξείδωση λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροσάνια)

προϊόντων της υπεροξειδωσης. Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματός μας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS και στους δύο ιστούς, τόσο στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με την ομάδα Control, όσο και στην ομάδα των 50ppm σε σχέση με εκείνη των 20ppm. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με τα control στο νεφρικό ιστό τα οξειδωμένα λιπίδια μειώθηκαν κατά 25,44% στην ομάδα των 20ppm και 37,28% στην ομάδα των 50ppm. Στον ιστό τετρακεφάλου οι αντίστοιχες μειώσεις ήταν 31,12% και 52,87%. Η μείωση των TBARS μεταξύ των φαινολικών ομάδων στο νεφρικό και στον ιστό τετρακεφάλου, κυμάνθηκε στο 15,89% και 29,98% αντίστοιχα. Η μείωση των TBARS στους προαναφερθέντες ιστούς ίσως οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα της GSH και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων που παρείχαν προστασία ενάντια στην οξείδωση των λιπιδίων. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοιρίδια, μειώθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos et al. 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Cardinali et al., 2012; Rubio-Senent et al., 2015). Η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος των κοτόπουλων, αφού η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας των πουλερικών είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (Arshad et al., 2013) Ειδικότερα, η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Nama and Ahn, 2003).

- Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση ενός μεγάλου φάσματος αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει

αποδειχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος. Παράλληλα, μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών και την συσσωμάτωση επηρεάζοντας την πεπτικότητα τους. Οι παραπάνω παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν αλλοίωση της ποιότητας και στη μείωση της θρεπτικής αξίας του κρέατος. (Zhang et al., 2013; Villaverde et al., 2014; Lund et al., 2011). Με τη μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προέκυψε και στους δυο ιστούς, ότι από την σύγκριση των τριών ομάδων υπήρξε μείωση των καρβονυλίων στατιστικά σημαντική τόσο στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με την ομάδα control, όσο και ανάμεσα στις δύο πολυφαινολικές ομάδες. Στο νεφρικό ιστό, σε σχέση με την ομάδα control, η μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων της ομάδας των 20ppm ήταν 21,51%, ενώ της ομάδας των 50ppm ήταν 32,53%. Στον τετρακέφαλο οι τιμές ήταν αντίστοιχα 35,71% και 51,38%. Παράλληλα, η μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα των 50ppm σε σχέση με την ομάδα των 20ppm παρουσιάστηκε ίση με 14,04% στο νεφρικό ιστό και 24,38% στον τετρακέφαλο. Δηλαδή και στους δύο ιστούς παρατηρούμε ότι η επίδραση της σκόνης είναι ευεργετική καθώς μειώνεται η οξειδωση των πρωτεϊνών. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στους προαναφερθέντες ιστούς, σύμφωνα και με τα παραπάνω αποτελέσματά μας, η ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας (GSH και γενικά της TAC) παρείχε προστασία από την οξειδωση των πρωτεϊνών. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοιρίδια αλλά και σε κοτόπουλα, επίσης μειώθηκε η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών σε όλους τους ιστούς και στο αίμα αντίστοιχα (Gerasopoulos et al. 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας παρουσιάζουν ότι η ενσωμάτωση της πολυφαινολικής σκόνης, που παράγεται από νανοενθυλάκωση με χρήση μαλτοδεξτρίνης, από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την

διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά, βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Ειδικότερα, η προσθήκη της πολυφαινολικής σκόνης στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων, μειώνει την οξείδωση των πρωτεϊνών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, όπως αποδεικνύεται από την μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων στο πλάσμα. Επιπρόσθετα, η πολυφαινολική σκόνη στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων, μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων TBARS, ενός βιολογικού δείκτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Η παρατηρούμενη μείωση της οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων στα κοτόπουλα, μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους (TAC) και της ανηγμένης γλουταθειόνης(GSH). Πράγματι, οι ομάδες των κοτόπουλων που έπιναν νερό που περιείχε πολυφαινολική σκόνη, παρουσίασαν αυξημένη GSH και TAC στους υπό μελέτη ιστούς. Λόγω αυτού, τονίζεται η ανάγκη για την προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων στις ζωοτροφές των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, ιδίως σε πολύ μικρή ηλικία, όταν ο οργανισμός δεν είναι αρκετά ώριμος για να παράγει επαρκώς από μόνος του αντιοξειδωτικά μόρια όπως η GSH (*Gerasopoulos et al., 2015*).

Είναι ενδιαφέρον ότι σε όλους τους δείκτες του οξειδωτικού στρες φάνηκε πως η ομάδα Γ (500 ppm), παρουσίασε τα πλέον ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλότερη συγκέντρωση του πόσιμου νερού των κοτόπουλων σε πολυφαινολική σκόνη και να τονίσει ακόμη περισσότερο την αξία της στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα από όλους τους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέχθησαν, δείχνουν ότι η προσθήκη της σκόνης αυτής στο πόσιμο νερό των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του μυϊκού και νεφρικού ιστού με τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλ. οξείδωση πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων) και την αύξηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. δράσης των ενζύμων που διασπούν το H₂O₂ επίπεδα GSH και TAC). Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των ζώων εκτροφής θεωρείται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (*Lykkesfeldt and Svendsen, 2007*). Επίσης, ήταν σημαντικό ότι ένας από τους ιστούς που εξετάστηκαν ήταν ο μυϊκός

που αποτελεί το βρώσιμο μέρος του ζώου. Κατά συνέπεια, όπως προαναφέρθηκε, η αποτελεσματικότητα των συστατικών της πολυφαινολικής σκόνης ενάντια στην οξείδωση των πρωτεϊνών και λιπιδίων, αποτρέπει την υποβάθμιση της ποιότητας και τη μείωση της θρεπτικής αξίας του κρέατος. Το πολυφαινολικό αυτό προϊόν θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άλλες τροφές ζώων ή ακόμη και σε ανθρώπινα τρόφιμα σε συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Η χρήση της πολυφαινολικής σκόνης και ιδιαίτερα των υποπροϊόντων από την διαδικασία παρασκευής της, που μελετήθηκε πρόσφατα (*Gerasopoulos et al., 2015*), θα μπορούσε να είναι επίσης μία καλή λύση στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–6.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–22.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *The Biochemical Journal*, 258(2), 617–20.
- Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.
- Arshad, M.S. et al., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in health and disease*, 12, p.164
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23.
- BEERS, R. F., & SIZER, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–40.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–33.

- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Chance B., Sies H and Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605,1979.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*
- Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise.
- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*,
- Clementi, Emilio; Smith, Guy Charles; Howden, Martin; Dietrich, Salvador; Bugg, S; O'Connell, MJ; Goldsbrough, PB; Cobbett, CS (1999). «Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*». *The Plant cell* 11 (6): 1153–64.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp.872–879.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Petrotos, K., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with byproducts from olive oil mill

wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, 42–9.

Gerasopoulos, K., Stagos, D., Krouezas, A., Karaveli, C., Barda, C., Gkika, H., ... Kouretas, D. (n.d.). Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater In Vivo (Athens, Greece), 30(3), 291–301.

Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., Kokkas, S., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, 319–27.

Gerogianni, I., Gourgoulialis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. *Archives of Hellenic Medicine*. 23(5), pp.444–454.

Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., ... Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(1), 90–5.

Gilbert DL (2000). Fifty years of radical ideas, *Ann N Y Acad Sci*. 899: 1-14

Gkoutsidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. (2011). Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment. Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246.

Halliwell B, Marie Veronique Clement, Lee Hua Long(2000). Hydrogen peroxide in the human body

Halliwell B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.

- Halliwell B., Gutteridge J., 1999, Journal Article, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview
- Halliwell B., Gutteridge J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Halliwell, Barry (Mar 2015) *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. In: eLS.
- Hamden K., Allouche N, Damak M, Elfeki A, 2009, Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact.* 2009 Aug 14;180(3):421-32. doi: 10.1016/j.cbi.2009.04.002. Epub 2009 Apr 23.
- Hughes, R.E., 1964. Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues. *Nature*, 203, pp.1068–1069.
- Istvan Bokkon, (2012). *Recognition of Functional Roles of Free Radicals*
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*
- Klebanoff SJ (1988). Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York Raven, 391– 444.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15–21.
- Kumar, H. et al., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural product reports*, 31(1), pp.109–139.

- Lund, M.N. et al., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.83–95.
- Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M., Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *phanerochaetae chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366-371.
- Markoulis N, Gourgoulisanis KI, Moulas A, Gerogianni E, Molyvdas AP (2006). Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity.
- Nam, K.C. & Ahn, D.U., 2003. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat science*, 63(1), pp.1–8.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.
- Ramnath, V., Rekha, P. S., & Sujatha, K. S. (2008). Amelioration of heat stress induced disturbances of antioxidant defense system in chicken by brahma rasayana. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 5(1), 77–84.
- Rey, A. I., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Lopez-Bote, C. J., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of Animal Science*, 79(5), 1201–1208.

- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumpricht, E., Reddy, C.C., 1989. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci.* 570, pp.514–7.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 31S–38S.
- Silverstein, T. D., Jain, R., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., & Aggarwal, A. K. (2010). Structural basis for error-free replication of oxidatively damaged DNA by yeast DNA polymerase η . *Structure (London, England : 1993)*, 18(11), 1463–70.
- Tristan P. Dew, Andrea J. Day, and, & Morgan*, M. R. A. (2005). Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–89.
- Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1(1), 99–117.
- Villaverde, A., Morcuende, D. & Estevez, M., 2014. Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of food science*, 79(7), pp.C1331–42.
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–362.