

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αποτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Βιολειτουργικών Ζωοτροφών Εμπλουτισμένων με Υποπροϊόντα Οινοποιείου και Ελαιοτριβείου σε Κοτόπουλα και Πρόβατα Κρεοπαραγωγής.



Μακρή Σωτηρία
Περιβαλλοντολόγος
Λάρισα, 2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αποτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Βιολειτουργικών Ζωοτροφών Εμπλουτισμένων με Υποπροϊόντα Οινοποιείου και Ελαιοτριβείου σε Κοτόπουλα και Πρόβατα Κρεοπαραγωγής.

Μακρή Σωτηρία

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ: Καθηγητής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΠΕΤΡΩΤΟΣ: Καθηγητής Μηχανικής Μεταποίησης των Γεωργικών Προϊόντων, Τμήμα Γεωπονίας-Αγροτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ν. ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μακρή Σωτηρία

«Αποτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Βιολειτουργικών Ζωοτροφών
Εμπλουτισμένων με Υποπροϊόντα Οινοποιείου και Ελαιοτριβείου σε Κοτόπουλα και
Πρόβατα Κρεοπαραγωγής.»

Περίληψη

Τα στέμφυλα οινοποιίας και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) αποτελούν τα κύρια παραπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία των σταφυλιών κατά την οινοποίηση και της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου αντίστοιχα. Τα δυο αυτά παράγωγα χαρακτηρίζονται από υψηλό οργανικό φορτίο, με αποτέλεσμα να συνιστούν απόβλητα με σημαντικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Όμως παράλληλα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη βιοδραστικότητα και κλινικές ιδιότητες, κυρίως λόγω του υψηλού τους περιεχομένου σε πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Έτσι παρουσιάζουν ένα σημαντικό δυναμικό για χρησιμοποίηση στη διατροφή των παραγωγικών ζώων τα οποία είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε εκδήλωση ασθενειών λόγω της χαμηλής αντιοξειδωτικής τους άμυνας και έλλειψης προσαρμογής στις διατροφικές αλλαγές. Η ευζωία και η παραγωγικότητα των ζώων αυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον εκτροφής και τις συνθήκες ενσταβλισμού τους, επάγοντας στρεσογόνα φαινόμενα που συχνά οδηγούν στην εκδήλωση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων. Ως αποτέλεσμα, έχει αναπτυχθεί ένα σημαντικό ερευνητικό και επιχειρηματικό ενδιαφέρον για τη δημιουργία και χρησιμοποίηση ζωοτροφών που διαθέτουν με αντιοξειδωτική δράση και αποδεδειγμένες θεραπευτικές ιδιότητες.

Στο πλαίσιο υλοποίησης της διατριβής, 30 κοτόπουλα (ηλικίας 2 ημερών) και 24 πρόβατα εκτράφηκαν με ζωοτροφές που ήταν εμπλουτισμένες με στέμφυλα οινοποιίας και ΥΑΕ αντίστοιχα, πρόσθετα με γνωστές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες είχαν αποτιμηθεί με *in vitro* προσδιορισμούς. Η χορήγηση των ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε αφ' ενός για τα κοτόπουλα, από τις 2 μέχρι και τις 50 ημέρες μετά τη γέννησή τους, αφ' ετέρου για τα πρόβατα από τη 15^η μέχρι την 70^η ημέρα μετά τη γέννησή τους. Μετά το πέρας της χορήγησης του κύκλου εκάστης ζωοτροφής, ελήφθησαν δείγματα αίματος και ιστών ζωικών οργάνων τους σε δυο χρονικές στιγμές (μετά τη γέννησή τους 30 & 50 ημέρες για τα κοτόπουλα, 42 & 70 ημέρες για τα πρόβατα). Στα δείγματα μετρήθηκαν οι δείκτες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, την οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων και πρωτεϊνών, καθώς και τη δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων έδειξαν σε όλες τις περιπτώσεις μια ιστο-ειδική επίδραση, με τη γενική εικόνα και για τις δυο εμπλουτισμένες ζωοτροφές (με στέμφυλα και ΥΑΕ) να υποδεικνύει μείωση των

τοξικών επιδράσεων που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες και ενισχύουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ζώων. Ως συνέπεια, η χρησιμοποίηση των προσθέτων αυτών αφενός βελτιώνει την ευζωία και παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων ζώων και αφετέρου συμβάλει στη μείωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη εναπόθεσή τους στο περιβάλλον.

Abstract

Grape pomace (GP) and Olive oil mill wastewater (OMW) are the main by-products generated during various stages of wine and olive oil production, respectively. While both of these derivatives are distinguished by their high organic load and their association to environmental pollution, they also display potential biological and clinical significance due to their high polyphenolic content, and thus antioxidant capacity.

It is known that livestock are susceptible to diseases due to their low antioxidant defense system and their lack of adaptation to different dietary conditions. Additionally, their welfare and productivity are largely influenced by their farming environment, resulting in various pathological and stressful conditions. Recently, there is a great interest in the production and administration of animal feed with antioxidant activity and therapeutic properties.

The aim of this thesis is to investigate the potential bioactivity of these animal feeds. To that end, 30 broilers and 24 lambs were fed with two bio-functional feeds enriched with grape pomace and olive oil mill wastewater respectively, which were previously evaluated for their antioxidant activity through *in vitro* techniques. Following feed administration, blood and tissues of vital organs from broilers and lambs were collected at two time points (30 & 50 days for broilers, 42 & 70 days for lambs post-birth). Biomarkers for antioxidant capacity, oxidative damage to lipids and proteins, as well as protein expression and antioxidant activity were assessed in the collected samples. In contrast to blood, tissue-specific results were observed in both species, but generally, bio-functional feed with GP and OMW reduced toxic effects from oxidative stress and enhanced animal redox status. Consequently, welfare and productivity of livestock were improved, while the harnessing of these by-products could contribute in diminishing environmental pollution due to their uncontrolled disposal to aquatic ecosystems.

ΜΑΚΡΗ ΣΩΤΗΡΙΑ

«Αποτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Βιολειτουργικών Ζωοτροφών
Εμπλουτισμένων με Υποπροϊόντα Οινοποιείου και Ελαιοτριβείου σε Κοτόπουλα και
Πρόβατα Κρεοπαραγωγής.»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: 28

Συνολικός αριθμός σελίδων: 213

Συνολικός αριθμός εικόνων: 21

Συνολικός αριθμός πινάκων: 19

Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 38

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 274

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2014-2019 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημητρίου Κουρέτα. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου.

Γενικά στοιχεία, ερωτήματα και σκοπός της μελέτης:

Τα τελευταία χρόνια, οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν απασχολήσει εκτενώς την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία. Επιπλέον, όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται γύρω από την παραγωγή ζωοτροφών με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση, προκειμένου τα εκτρεφόμενα ζώα να προστατευθούν από πιθανές ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες. Σε αυτό το πλαίσιο, τα υποπροϊόντα οινοποίησης-στέμφυλα και ελαιοτριβείων-ΥΑΕ περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων και η αξιοποίησή τους έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού η χώρα μας έχει πληθώρα τέτοιων βιομηχανιών και αδυνατεί να αξιοποιήσει τα υποπροϊόντα τους. Αν και αρκετές μελέτες έχουν τονίσει την αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση των ενώσεων που περιέχονται στα στέμφυλα και τα ΥΑΕ σε διάφορους οργανισμούς, ωστόσο αυτές οι επιδράσεις των υποπροϊόντων δεν έχουν μελετηθεί σε επίπεδο παραγωγικών ζώων και σε τόσο ευρύ φάσμα και ποικιλία ιστών.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών εμπλουτισμένων με υποπροϊόντα οινοποίησης και ελαιοτριβείων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση κοτόπουλων και προβάτων κρεοπαραγωγής. Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε αρχικά η *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δυο ζωοτροφών σε σχέση με ζωοτροφές του εμπορίου και στη συνέχεια η χορήγησή τους στα ζώα όπου σε δείγματα διαφόρων ιστών και αίματος, μετρήθηκαν βιοδείκτες που σχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό προφίλ τους,

καθώς και ενζυμική δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, ώστε να διερευνηθεί η εν τω βάθει επίδραση των ζωοτροφών. Τα αποτελέσματα αναμένεται να διαλευκάνουν αν τελικά είναι θετική η χορήγηση τέτοιων ζωοτροφών εμπλουτισμένων με υποπροϊόντα αγροτοβιομηχανιών σε επίπεδο παραγωγικών πλέον ζώων, με στόχο τελικά την αξιοποίησή τους από κτηνοτροφικές μονάδες και την ελάφρυνση του περιβάλλοντος εξ' αιτίας της ανεξέλεγκτης εναπόθεσής τους σε αυτό, στα πλαίσια μια κυκλικής οικονομίας.

Ερωτήματα μελέτης:

Τα βασικά ερωτήματα της διδακτορικής έρευνας ήταν τα εξής:

1. Οι εμπλουτισμένες ζωοτροφές έχουν θετική επίδραση στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των παραγωγικών ζώων;
2. Όλοι οι μελετηθέντες ιστοί ακολουθούν το ίδιο προφίλ σε κάθε βιοδείκτη ή παρουσιάζουν ιστο-ειδικότητα;
3. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών που παρατηρείται *in vitro*, εμφανίζεται και *in vivo*;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής:

- Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T, Petrotos K, Gerasopoulos K, Mpesios A, Goutzourelas N, Kokkas S, Goulas P, Komiotis D and Kouretas D. *Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs*. Food Chem Toxicol. 2017 Jan; 102: 24–31.
- Makri S, Kafantaris I, Savva S, Ntanou P, Stagos D, Argyroulis I, Kotsambasi B, Christodoulou V, Gerasopoulos K, Petrotos K, Komiotis D and Kouretas D. *Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs*. In Vivo. 2018; 32(2):291–302.
- Makri S, Raftopoulou S, Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Veskoukis A.S and Kouretas D. *Feed supplemented with olive oil mill wastewater improves tissue antioxidant profile of lambs*. Oxid Med Cell Longev.

- Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, Kafantaris I, Makri S, Stagos D, Gerasopoulos K, Anisimov N. Y, Tsatsakis A. M and Kouretas D. *Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep*. Toxicol Reports. 2017; 4:364–72.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

...και κάπως έτσι μια πορεία πέντε χρόνων φτάνει στο τέλος της! Μια πορεία που αν δεν είχα γύρω μου ανθρώπους να με στηρίζουν σε όλο αυτό, δεν θα 'χα καταφέρει τίποτα... και αυτοί είναι κατά βάση οι γονείς μου. Ήταν δίπλα μου σε όλα τα άγχη, τις αγωνίες, τα νεύρα. Ήταν εκεί και σε όλες τις μικρές επιτυχίες μου καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού. Εκείνοι απορροφούσαν όλη την ένταση με υπομονή και συμβουλές για να προχωρώ και να συνεχίζω.

Δεν θα μπορούσα να παραλήψω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Κουρέτα Δημήτριο που μου έδωσε την ευκαιρία να διανύσω μαζί του αυτή την πορεία στο εργαστήριό του. Ερχόμενος από διαφορετικό επιστημονικό κλάδο και ήταν εκείνος που μέσα από στήριξη, αλλά και...πίεση, με βοήθησε να ανταπεξέλθω. Λέει πως στην αρχή τον δυσκόλεψα πολύ, πως μπήκα κοριτσάκι και ακόμη με τα μυαλά της φοιτήτριας. Πέντε χρόνια μετά ο ίδιος συνέβαλε στη διαμόρφωση της σκέψης και κρίσης μου, μου δίδαξε τι σημαίνει αντοχή σε όλα τα επίπεδα και τον ευχαριστώ...μεγάλωσα. Επίσης θα ήταν σημαντική μου παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα θερμά τον κύριο Στάγκο Δημήτριο, ο οποίος συνέβαλε με τις γνώσεις και την εμπειρία του, στην επίλυση διαφόρων προβλημάτων που συνάντησα. Είχε την πιο κατάλληλη και σωστή λύση όταν προέκυπταν προβλήματα στην πορεία των πειραμάτων μου, όπως και για τις διορθώσεις και τις υποδείξεις του στις δημοσιεύσεις μου.

Μέσα στο εργαστήριο βρήκα μια δεύτερη οικογένεια (μοναχοπαίδι γαρ). Είναι οι συνοδοιπόροι και φίλοι μου σε όλη την πορεία του διδακτορικού μου. Αλέξανδρε, Βίβιαν, Άκη σας ευχαριστώ για την τεράστια στήριξή σας, τόσο σε επίπεδο γνώσεων όσο και ψυχολογικά. Μαζί σας μοιράστηκα τις πιο όμορφες στιγμές, αλλά και τις πιο δύσκολες (από πολλές απόψεις!!) και αν δεν ήσασταν μαζί μου, δεν θα μπορούσα να φτάσω μέχρι το τέλος. Είναι τόσες πολλές, που ξεπερνούν τα στενά πλαίσια του εργαστηρίου και θα μείνουν πάντα χαραγμένες στη μνήμη μας. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Γκουτζουρέλα Νικόλαο, τον διδάκτορα κ. Γερασόπουλο Κώστα, τον κ. Μπέσιο Τάσο που με βοήθησαν στο ξεκίνημα του διδακτορικού, τους μεταδιδάκτορες Θάλεια Κερασιώτη και Άρη Βεσκούκη που με τις υποδείξεις και τις συμβουλές τους σε επιστημονικό επίπεδο με ώθησαν να αναζητώ απαντήσεις στα ερωτήματα που προέκυπταν.

Τους ευχαριστώ όλους και έναν-έναν ξεχωριστά!!

*Στο τέλος όλα θα πάνε καλά.
Αν δεν πάνε καλά, απλά δεν είναι το τέλος...*
Paulo Coelho

Στους γονείς μου...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....	5
Abstract	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	21
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	22
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	24
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
1.1. Το σταφύλι.....	30
1.1.1. Η ιστορία του.....	30
1.1.2. Οι θεραπευτικές του ιδιότητες.....	31
1.1.3. Τα στέμφυλα οиноποίησης.....	33
1.1.3.1. Χαρακτηριστικά των στεμφύλων	34
1.1.3.2. Περιβαλλοντικά προβλήματα από τα στέμφυλα	34
1.2. Η ελιά	35
1.2.1. Η ιστορία και οι θεραπευτικές ιδιότητες της ελιάς και του ελαιολάδου	36
1.2.2. Παραπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου	37
1.2.3. Τύποι ελαιοτριβείων	38
1.2.3.1. Τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία	38
1.2.3.2. Διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία.....	39
1.2.4. Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	40
1.2.4.1. Χαρακτηριστικά των ΥΑΕ	41
1.2.4.2. Περιβαλλοντικά προβλήματα από τα ΥΑΕ.....	41
1.3. Ελεύθερες ρίζες.....	42

1.3.1.	Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών	44
1.3.2.	Είδη ελευθέρων ριζών.....	44
1.3.2.1.	Ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).....	44
1.3.2.2.	Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).....	45
1.3.2.3.	Ρίζα Υδροξυλίου (HO^{\cdot}).....	45
1.3.3.	Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	45
1.3.3.1.	Αναπνευστική αλυσος - Οξειδωτική φωσφορυλίωση	45
1.3.3.2.	Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (XO).....	46
1.3.3.3.	Φλεγμονή.....	47
1.3.4.	Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	48
	48
1.3.5.	Βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών	48
1.4.	Οξειδωτικό στρες.....	50
1.5.	Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	51
1.5.1.	Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας.....	52
1.5.1.1.	Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	52
1.5.1.2.	Καταλάση (CAT)	52
1.5.1.3.	Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)	52
1.5.1.4.	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	53
1.5.1.5.	Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs).....	53
1.5.1.6.	Λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL).....	53
1.5.1.7.	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2)	54
1.5.2.	Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας	55
1.5.2.1.	Βιταμίνες C και E.....	55
1.5.2.2.	Γλουταθειόνη.....	55
	56
1.5.2.3.	Ουρικό οξύ.....	56
1.5.2.4.	Πολυφαινόλες	56

1.6.	Βιοδραστικές ενώσεις φυτικών προϊόντων	62
1.6.1.	Οι πολυφαινόλες των στεμφύλων.....	62
1.6.2.	Οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ	63
1.7.	Σκοπός της διατριβής	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Παρασκευή και μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών με <i>in vitro</i> τεχνικές		67
2.1.	Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών.....	68
2.1.1.	Εισαγωγή.....	68
2.1.2.	Ενσίρωση.....	68
2.1.3.	Διαδικασία παρασκευής ενσιρωμάτων	69
2.1.3.1.	Σιτηρέσιο με υποπροϊόντα οινοποίησης - Στέμφυλα	71
2.1.3.2.	Σιτηρέσιο με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ).....	72
2.2.	<i>In vitro</i> αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των βιολειτουργικών ζωοτροφών	75
2.2.1.	Παρασκευή εκχυλισμάτων ζωοτροφών	75
2.2.2.	Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH*	75
2.2.3.	Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS*	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – <i>In vivo</i> χορήγηση και μελέτη της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών, με χρήση βιοδεικτών, σε αίμα και ιστούς από κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής.		80
3.1.	Πειραματικός σχεδιασμός χορήγησης βιολειτουργικών ζωοτροφών	81
3.1.1.	Πειραματικό πλάνο χορήγησης βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης σε νεαρά κοτόπουλα κρεοπαραγωγής	81
3.1.2.	Πειραματικό πλάνο χορήγησης βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα ελαιοτριβείου σε νεαρά πρόβατα κρεοπαραγωγής	83
3.2.	Συλλογή αίματος και ιστών	85

3.2.1.	Επεξεργασία αίματος	85
3.2.2.	Ομογενοποίηση ιστών για τη μέτρηση βιοδεικτών	86
3.3.	Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα και στους ιστούς των ζώων.....	87
3.3.1.	Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin – Hb) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	87
3.3.2.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford σε πλάσμα και ιστούς.....	88
3.3.3.	Μέτρηση επιπέδων Γλουταθειόνης	89
3.3.3.1.	Καθαρισμός RBCL	89
3.3.3.2.	Καθαρισμός ιστών	90
3.3.4.	Ικανότητα διάσπασης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂).....	92
3.3.5.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total antioxidant capacity – TAC)	93
3.3.6.	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	95
3.3.7.	Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB).....	96
3.3.8.	Στατιστική ανάλυση.....	98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Μελέτη της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στη δραστικότητα και την πρωτεϊνική έκφραση ενζύμων στους ιστούς κοτόπουλων και προβάτων κρεοπαραγωγής.	99
--	----

4.1.	Ομογενοποίηση ιστών για τη μέτρηση δραστικότητας των ενζύμων GST και SOD	100
4.1.1.	Δραστικότητα της S – τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Glutathione S – Transferase, GST).....	100
4.1.2.	Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD).....	102
4.2.	Ομογενοποίηση ιστών για την πρωτεϊνική έκφραση της γ – GCL....	103
4.2.1.	Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της λιγάσης της γ – γλουταμιλοκυστεΐνης (γ – GCL).....	104

4.3.	Στατιστική ανάλυση.....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – Αποτελέσματα της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο αίμα και σε ιστούς από κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής.....		
5.1.	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών	108
5.1.1.	Αντιοξειδωτική δράση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης – Στέμφυλα.....	108
5.1.1.1.	Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•.....	108
5.1.1.2.	Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•.....	109
5.1.2.	Αντιοξειδωτική δράση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	110
5.1.2.1.	Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•.....	110
5.1.2.2.	Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•.....	111
5.2.	Παραγωγικά στοιχεία των δύο ζωικών ειδών.....	112
5.2.1.	Κοτόπουλα – Στέμφυλα	112
5.2.1.1.	Κατανάλωση ζωοτροφών	112
5.2.1.2.	Μεταβολή του βάρους των πουλερικών.....	113
5.2.2.	Πρόβατα – Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	115
5.2.2.1.	Κατανάλωση ζωοτροφών	115
5.2.2.2.	Μεταβολή του βάρους των προβάτων	116
5.3.	Οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αίμα και ιστούς των κοτόπουλων – Ζωοτροφή με στέμφυλα.....	118
5.3.1.	Αποτελέσματα που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών στα κοτόπουλα.....	118
5.3.1.1.	Αίμα.....	118
5.3.1.2.	Ιστοί.....	121

5.3.2.	Αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των ζωοτροφών σε οξειδωτικές βλάβες λιπιδίων και πρωτεϊνών	125
5.3.2.1.	Αίμα.....	125
5.3.2.2.	Ιστοί.....	127
5.3.3.	Συζήτηση.....	131
5.3.3.1.	Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας	132
5.3.3.2.	Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες.....	136
5.4.	Οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αίμα και ιστούς των προβάτων – Ζωοτροφή με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ).....	139
5.4.1.	Αποτελέσματα που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών στα πρόβατα	139
5.4.1.1.	Αίμα.....	139
5.4.1.2.	Ιστοί.....	141
5.4.2.	Αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των ζωοτροφών σε οξειδωτικές βλάβες λιπιδίων και πρωτεϊνών	146
5.4.2.1.	Αίμα.....	146
5.4.2.2.	Ιστοί.....	147
5.4.3.	Συζήτηση.....	152
5.4.3.1.	Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας	153
5.4.3.2.	Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες.....	157
5.5.	Δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ιστούς των ζώων.....	160
5.5.1.	Αποτελέσματα GST, SOD και γ-GCL στους ιστούς των κοτόπουλων – Ζωοτροφή με στέμφυλα.....	160

5.5.1.1.	Δραστικότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST)	160
5.5.1.2.	Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)	161
5.5.1.3.	Πρωτεϊνική έκφραση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (γ-GCL) ...	163
5.5.2.	Συζήτηση	166
5.5.3.	Αποτελέσματα GST, SOD και γ-GCL στους ιστούς των προβάτων – Ζωοτροφή με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	173
5.5.3.1.	Δραστικότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST)	173
5.5.3.2.	Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)	174
5.5.3.3.	Πρωτεϊνική έκφραση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (γ-GCL) ...	176
5.5.4.	Συζήτηση	179
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	185
	Βιβλιογραφία	189

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Εναπόθεση στεμφύλων στο περιβάλλον	35
Εικόνα 2. Εναπόθεση ΥΑΕ στο υδάτινο περιβάλλον.....	42
Εικόνα 3. Δομή ελευθέρων ριζών	43
Εικόνα 4. Ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο.....	43
Εικόνα 5. Αναπνευστική αλυσος.....	46
Εικόνα 6. Παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης.....	47
Εικόνα 7. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών	48
Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση της γουανίνης του DNA με ROS που οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυδεογουανοσίνης (8-OHdG).....	49
Εικόνα 9. Διαταραχή ισορροπίας οξειδοαναγωγικής κατάστασης.....	51
Εικόνα 10. Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2	54
Εικόνα 11. Δομή της γλουταθειόνης	56
Εικόνα 12. (i) Διαδικασία συσκευασίας με μηχανήμα αποσυμπίεσης και (ii) τρόπος αποθήκευσης ενσιρωμάτων	70
Εικόνα 13. Ενσιρώματα καλαμποκιού για τις ζωοτροφές των νεαρών κοτόπουλων (i) ομάδας ελέγχου και (ii) ομάδας στεμφύλων	71
Εικόνα 14. Ενσιρώματα καλαμποκιού για τις ζωοτροφές των νεαρών προβάτων (i) ομάδας ελέγχου και (ii) ομάδας ΥΑΕ	73
Εικόνα 15. Μετατροπή της ρίζας DPPH• στην αντίστοιχη υδραζίνη παρουσία ενός αντιοξειδωτικού	76
Εικόνα 16. Παραγωγή της ρίζας ABTS •+ μέσω HRP παρουσία H ₂ O ₂	78
Εικόνα 17. Αναγωγή της ρίζας ABTS •+ παρουσία αντιοξειδωτικού.....	78
Εικόνα 18. Σχεδιασμός πειραμάτων με ενσίρωμα στεμφύλων στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής.....	82
Εικόνα 19. Σχεδιασμός πειραμάτων με ενσίρωμα ΥΑΕ στα πρόβατα κρεοπαραγωγής. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν τη θανάτωση των ζώων στην αντίστοιχη χρονική στιγμή.....	84
Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.....	89
Εικόνα 21. Διάταξη και απεικόνιση της διαδικασίας μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πίκτωμα στην μεμβράνη PVDF.....	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κατηγορίες Φλαβονοειδών	58
Πίνακας 2. Χημική δομή των πολυφαινολικών οξέων	59
Πίνακας 3. Οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια. Οι τιμές του πίνακα είναι εκφρασμένες σε mg/g.	63
Πίνακας 4. Πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων ελαιολιπιδίου.....	64
Πίνακας 5. Σύσταση πειραματικού σιτηρεσίου για τη διατροφή των κοτόπουλων	72
Πίνακας 6. Σύσταση πειραματικού σιτηρεσίου για τη διατροφή των προβάτων – Πριν τον απογαλακτισμό	73
Πίνακας 7. Σύσταση πειραματικού σιτηρεσίου για τη διατροφή των προβάτων – Μετά τον απογαλακτισμό	74
Πίνακας 8. Διαδοχική σειρά και ποσότητες προσθήκης αντιδραστηρίων.....	77
Πίνακας 9. Έλεγχος απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας, σε μεθανόλη.....	77
Πίνακας 10. Διαδοχική σειρά και ποσότητες προσθήκης αντιδραστηρίων.....	79
Πίνακας 11. Έλεγχος απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας, απουσία HRP	79
Πίνακας 12. Σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων - Hb.....	87
Πίνακας 13. Σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων - GSH.....	90
Πίνακας 14. Ποσότητες αντιδραστηρίων για το πλάσμα	94
Πίνακας 15. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τους ιστούς.....	94
Πίνακας 16. Σύνοψη αποτελεσμάτων επίδρασης της ζωοτροφής με στέμφυλα στους βιοδείκτες των πουλερικών κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (30 και 50 ημέρες).....	130
Πίνακας 17. Σύνοψη αποτελεσμάτων επίδρασης της ζωοτροφής με ΥΑΕ στους βιοδείκτες των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (42 και 70 ημέρες).....	151
Πίνακας 18. Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης της ζωοτροφής με στέμφυλα στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ιστών των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (30 και 50 ημέρες).....	165

Πίνακας 19. Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης της ζωοτροφής με ΥΑΕ στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ιστών των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (42 και 70 ημέρες)..... 178

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και στεμφύλων) που χορηγήθηκαν στα νεαρά κοτόπουλα.	108
Διάγραμμα 2. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και στεμφύλων) που χορηγήθηκαν στα νεαρά κοτόπουλα.	109
Διάγραμμα 3. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ) που χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα (i) πριν τη φάση του απογαλακτισμού και (ii) μετά τον απογαλακτισμό.....	110
Διάγραμμα 4. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ) που χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα (i) πριν τη φάση του απογαλακτισμού και (ii) μετά τον απογαλακτισμό.....	111
Διάγραμμα 5. Ημερήσια κατανάλωση των δύο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) από την έναρξη (ημέρα 2) μέχρι τη λήξη του πειράματος (ημέρα 50). 112	
Διάγραμμα 6. Μέση κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) από τα κοτόπουλα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.	112
Διάγραμμα 7. Ημερήσια μεταβολή του βάρους των πουλερικών μεταξύ των δυο πειραματικών ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) από την έναρξη (ημέρα 2) μέχρι τη λήξη του πειράματος (ημέρα 50).....	113
Διάγραμμα 8. Μέση μεταβολή του βάρους των πουλερικών μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.....	114
Διάγραμμα 9. Ημερήσια κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) από τα πρόβατα, κατά την έναρξη χορήγησης της τροφής (ημέρα 16 – σημείο 0) έως το τέλος του πειράματος (ημέρα 70).....	115
Διάγραμμα 10. Μέση κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) από τα πρόβατα, κατά την έναρξη χορήγησης της τροφής (ημέρα 16) έως το τέλος του πειράματος (ημέρα 70).....	115
Διάγραμμα 11. Ημερήσια μεταβολή σωματικού βάρους των αμνών μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.	116
Διάγραμμα 12. Μέσο ημερήσιο κέρδος βάρους των αμνών (average daily gain) μεταξύ των δυο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) σε κάθε ξεχωριστό στάδιο δειγματοληψίας.	117

- Διάγραμμα 13. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). 118
- Διάγραμμα 14. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες)..... 119
- Διάγραμμα 15. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). 119
- Διάγραμμα 16. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. 121
- Διάγραμμα 17. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. 122
- Διάγραμμα 18. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους..... 123
- Διάγραμμα 19. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων (TBARS) στο πλάσμα των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). 125
- Διάγραμμα 20. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα υπεροξειδωσης πρωτεϊνών (CARB) στο πλάσμα των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). .. 125
- Διάγραμμα 21. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων (TBARS) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους..... 127

- Διάγραμμα 22. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα υπεροξειδωσής πρωτεϊνών (CARB) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους..... 128
- Διάγραμμα 23. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειματοληψίας (42 και 70 ημέρες)..... 139
- Διάγραμμα 24. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειματοληψίας (42 και 70 ημέρες)..... 140
- Διάγραμμα 25. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειματοληψίας (42 και 70 ημέρες). 140
- Διάγραμμα 26. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 142
- Διάγραμμα 27. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂ στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 143
- Διάγραμμα 28. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 144
- Διάγραμμα 29. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα οξειδωσής λιπιδίων (TBARS) στο πλάσμα των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειματοληψίας (42 και 70 ημέρες). 146
- Διάγραμμα 30. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα υπεροξειδωσής πρωτεϊνών (CARB) στο πλάσμα των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειματοληψίας (42 και 70 ημέρες)..... 146
- Διάγραμμα 31. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα οξειδωσής λιπιδίων (TBARS) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 148

- Διάγραμμα 32. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα υπεροξειδωσής πρωτεϊνών (CARB) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 149
- Διάγραμμα 33. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στη δραστικότητα της GST σε ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους..... 160
- Διάγραμμα 34. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στη δραστικότητα της SOD σε ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους..... 162
- Διάγραμμα 35. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα ελέγχου. Σαν μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)..... 163
- Διάγραμμα 36. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στη δραστικότητα της GST σε ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 173
- Διάγραμμα 37. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στη δραστικότητα της SOD σε ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. 175
- Διάγραμμα 38. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στην πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα ελέγχου. Σαν μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)..... 176

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

YAE		Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου
COD	Chemical oxygen demand	Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
BOD	Biochemical oxygen demand	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RNS	Reactive Nitrogen Species	Δραστικές μορφές αζώτου
O₂^{•-}	Superoxide radical	Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος
HO[•]	Hydroxyl radical	Ρίζα υδροξυλίου
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
XO	Xanthine oxidase	Οξειδάση της ξανθίνης
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Catalase	Καταλάση
γ-GCL	gamma-glutamylcysteine	Λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Glutathione reductase	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
GST	Glutathione S-transferase	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GS	Glutathione synthase	Συνθάση της γλουταθειόνης
GSH	Reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Oxidized glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
Prx	Peroxiredoxins	Περοξειρεδοξίνες
DPPH[•]	1,1-didhenyl-2-picrylhydrazyl	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	2,2'-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
HRP	Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του χρένου
RT	Room temperature	Θερμοκρασία δωματίου
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
RBCL	Red blood cell lysate	Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

TAC	Total antioxidant capacity	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS	Thiobarbituric Reactive Substances	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
MDA	Malondialdehyde	Μηλονική διαλδεϋδη
CARB	Protein carbonyls	Πρωτεϊνικά καρβονύλια
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
PBS	Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	διθειο-δυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	1-χλωρο, 2,4-δινιτροβενζόλιο
AREs	Antioxidant response elements	Αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το σταφύλι

Είναι ο καρπός του φυλλοβόλου ανθοφόρου φυτού *Vitis*, η γνωστή άμπελος. Το σταφύλι αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες φρούτων σε όλο τον κόσμο. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Οίνου και Αμπέλου (International Organisation of Vine and Wine-OIV), η παγκόσμια καλλιέργεια του αμπελιού ανέρχεται σε πάνω από 100.000.000 στρέμματα, τα οποία κατανομούνται σε 50 περίπου χώρες σε όλο τον κόσμο, με επίκεντρο όμως την Ευρώπη. Οι τρεις ευρωπαϊκές χώρες Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία καλύπτουν τα 75% της αμπελουργικής έκτασης της Ευρώπης, ενώ η Ελλάδα με περίπου 1.110.000 στρέμματα αμπελώνων (Eurostat, 2017) παράγει ετησίως 300 εκατομμύρια λίτρα οίνου διαφόρων ποικιλιών (OIV).

1.1.1. Η ιστορία του

Η καλλιέργεια του σταφυλιού άρχισε πριν από περίπου 6.000-8.000 χρόνια στην Εγγύς Ανατολή (1). Στον ανθρώπινο πολιτισμό, τα πρώτα στοιχεία για τη σημαντική θέση της αξιοποίησης του σταφυλιού στην καθημερινότητα χρονολογούνται περίπου πριν από 8.000 χρόνια στη Γεωργία (2). Οι πιο παλιές οινοποιητικές εγκαταστάσεις βρέθηκαν στην Αρμενία γύρω στο 4.000 π.Χ. Από τα αρχαία ιερογλυφικά της Αιγύπτου υπάρχουν στοιχεία που βεβαιώνουν την καλλιέργεια σταφυλιών τόσο για την κατανάλωσή τους, όσο και για την παραγωγή κρασιού από τους αρχαίους Έλληνες, τους Φοίνικες και τους Ρωμαίους. Με την πάροδο των ετών, η καλλιέργεια σταφυλιών θα περάσει στη συνέχεια σε άλλες περιοχές της Ευρώπης, της Βόρειας Αφρικής και τελικά της Βόρειας Αμερικής.

Στην Ελλάδα, τα πρώτα δείγματα καλλιέργειας αμπελιών τοποθετούνται στην ανατολική Μακεδονία ήδη από την περίοδο 2800-2200 π.Χ., στην πόλη των Φιλίππων. Περί το 600 π.Χ. Έλληνες και Φοίνικες μετέφεραν αμπέλια στη Σικελία και διέδωσαν την καλλιέργεια του αμπελιού στη Γαλλία και τη Βρετανία. Ο Όμηρος αναφέρεται συχνά στο αμπέλι και μάλιστα οι αρχαίοι Έλληνες είχαν συγκεκριμένο Θεό αφιερωμένο στο κρασί, το Θεό Διόνυσο, και το ονόμαζαν «νέκταρ των θεών». Το 13^ο αιώνα μ.Χ., πια, οι Άραβες διοχετεύουν την καλλιέργεια του σταφυλιού σε Ισπανία και Πορτογαλία και μέχρι το

17^ο αιώνα η καλλιέργειά του γίνεται γνωστή σε όλη σχεδόν την Ευρώπη (1). Σήμερα υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες ειδών σταφυλιών: τα ευρωπαϊκά (*Vitis vinifera*), τα σταφύλια της Βόρειας Αμερικής (*Vitis labrusca* και *Vitis rotundifolia*) και τα γαλλικά σταφύλια. Επιπλέον, τα σταφύλια χωρίζονται ανάλογα με τη χρήση τους, αν δηλαδή θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή κρασιού ή θα περάσουν στην κατανάλωση, και ανάλογα με το χρώμα τους, σε πράσινα, κόκκινα και μωβ. Στην Ελλάδα η πιο γνωστή ποικιλία επιτραπέζιων σταφυλιών είναι η σουλτανίνα κορινθίας και οι πιο γνωστές ποικιλίες κρασιών είναι το αγιωργίτικο, το μοσχοφύλερο, το ασύρτικο και το ξινόμαυρο. Τα σταφύλια είναι πλούσια σε βιταμίνες (A, K, C) και ιχνοστοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, σίδηρο, φώσφορο, μαγνήσιο και σελήνιο (3).

1.1.2. Οι θεραπευτικές του ιδιότητες

Από τα ποικίλα φυτοχημικά που εμπεριέχονται στα σταφύλια, οι πολυφαινόλες είναι οι περισσότερο γνωστές για τη βιοδραστικότητά τους και τις ευεργετικές στην υγεία του ανθρώπου ιδιότητές τους. Οι κυριότερες πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες, τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες της φλούδας, ενώ τα φλαβονοειδή περιέχονται στους σπόρους και στα στελέχη. Αυτές οι πολυφαινόλες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα, στο βλαστό και στα γίγαρτα (κουκούτσια) των σταφυλιών παρά στο χυμώδες τμήμα τους (3).

Εξαιτίας της πλούσιας περιεκτικότητας των σταφυλιών σε θρεπτικές ουσίες, η κατανάλωσή του δρα ευεργετικά στον οργανισμό, προσδίδοντάς του πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων (4). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για αυτές τις ιδιότητες του σταφυλιού. Η κατανάλωσή του έχει ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του πεπτικού συστήματος, της καρδιάς, του αναπνευστικού, του ανοσοποιητικού συστήματος (5,6). Η καρδιοπροστατευτική δράση των σταφυλιών οφείλεται στην αντιθηρωματική δράση των ενώσεων που περιέχονται σε αυτά, βελτιώνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού του αίματος και κατ' επέκταση παρεμποδίζοντας την οξειδωση των LDL και την παρεπόμενη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (3,7,8). Βοηθά επίσης στην υγεία των οστών, εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά ιχνοστοιχεία όπως ο χαλκός, ο σίδηρος και το μαγγάνιο, αποτρέποντας την εμφάνιση οστεοπόρωσης (9,10).

Οι Zurine και συνεργάτες επισημαίνουν τη δράση των βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στο σταφύλι, προσδίδοντας αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επιπλέον οι ίδιοι στη μελέτη τους επισημαίνουν την προστατευτική δράση του σταφυλιού έναντι της εμφάνισης διαβήτη (6). Άλλες μελέτες αναφέρονται στην αντιφλεγμονώδη-προστατευτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων των σταφυλιών σε σχέση με την εμφάνιση παχυσαρκίας και σακχαρώδους διαβήτη (11,12). Επίσης, οι Vislocky και συνεργάτες αναφέρονται στις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης των σταφυλιών σε σχέση με την εμφάνιση χρόνιων νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Νόσος *Alzheimer*, *Parkinson*), του διαβήτη, της γήρανσης, καθώς και στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, επειδή είναι πλούσια σε βιταμίνες K, A, C (7). Τέλος, σε πλήθος μελετών γίνεται αναφορά και στις αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές και αντιυπερτασικές ιδιότητες των σταφυλιών (13–15).

Η *trans*-ρεσβερατρόλη, η πλέον σημαντική φαινόλη των σταφυλιών, παρουσιάζει σημαντική χημειοπροστατευτική αντικαρκινική δράση μέσω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της (16,17). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης έχουν αποδειχθεί σε μελέτες κατά τις οποίες η χορήγησή της συνδυάστηκε με αυξημένη παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων και μείωση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (18,19). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αρσενικούς αρουραίους παρατηρήθηκε ότι το οξειδωτικό στρες μειώθηκε έπειτα από χορήγηση ρεσβερατρόλης (20,21). Παράλληλα, η αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης μελετήθηκε για πρώτη φορά από τον Jang και συνεργάτες όταν διαπίστωσαν τη χημειοπροστατευτική της δράση έναντι και των τριών σταδίων της καρκινογένεσης (16,22). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ρεσβερατρόλη εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του μαστού (23,24), του ήπατος (25), του οισοφάγου (26) και του παχέος εντέρου (27,28). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι αναστέλλει την εμφάνιση καρκίνου του μαστού που επάγεται από τα οιστρογόνα μέσω της έκφρασης αντιοξειδωτικών γονιδίων επαγόμενης από το μονοπάτι του Nrf2 (17). Οι Levi και συνεργάτες διαπίστωσαν στη μελέτη τους ότι γυναίκες που κατανάλωσαν σταφύλια πλούσια σε ρεσβερατρόλη είχαν 50% ή και μεγαλύτερη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού (29). Χαμηλές ημερήσιες δόσεις ρεσβερατρόλης σε ζώα, όπως εκείνες που λαμβάνονται από

την κατανάλωση κόκκινου κρασιού, θα μπορούσαν να είναι θεραπευτικές σε ορισμένες περιπτώσεις (17).

Η χημειοπροστατευτική δράση της μέσω του αντιοξειδωτικού της δυναμικού έχει μελετηθεί *in vitro* στο πλαίσιο του καρκίνου του μαστού, του παγκρέατος και του προστάτη, αφού καταστέλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, μέσω σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (17). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη μειώνει την απόπτωση κυττάρων που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες και τις επαγόμενες από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβες του DNA, προκαλώντας τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (17,30). Τα ευρήματα από τέτοιες μελέτες υποδηλώνουν ότι η ρεσβερατρόλη επιδεικνύει χημειοπροστατευτικές επιδράσεις οι οποίες προκαλούνται από την ενεργοποίηση του Nrf2 (17). Γενικώς η αντικαρκινική δράση των σταφυλιών πραγματοποιείται μέσω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης, τροποποιώντας βιοχημικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (16,22).

1.1.3. Τα στέμφυλα οινοποίησης

Η οινοποίηση είναι η μετατροπή των σταφυλιών σε οίνο με τη βοήθεια ενζύμων, εφαρμόζοντας μια επιλεγμένη τεχνική. Πιο συγκεκριμένα, είναι η διαδικασία εκχύλισης όλων των ποιοτικών στοιχείων και ουσιών που εμπεριέχει το σταφύλι, οι οποίες συμβάλλουν στην ποιότητα του κρασιού (31). Τα σταφύλια είναι η μεγαλύτερη καλλιέργεια φρούτων στον κόσμο με περισσότερους από 60 εκατομμύρια τόνους παραγωγής το χρόνο. Από αυτά, περίπου το 80% της συνολικής παραγωγής τους χρησιμοποιείται στην οινοποίηση για την παραγωγή του κρασιού (32). Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης παράγονται τα στέμφυλα τα οποία αποτελούν τα παραπροϊόντα της οινοποίησης και αντιστοιχούν περίπου στο 14-17% του βάρους των σταφυλιών που έχουν μεταποιηθεί από τα οινοποιεία (32-34). Τα στέμφυλα είναι τα στερεά υπολείμματα των σταφυλιών μετά από πίεση για την εξαγωγή κρασιού, που περιέχουν τη σάρκα, τον πολτό, τους σπόρους και τους μίσχους. Σήμερα, τα στέμφυλα χρησιμοποιούνται κυρίως ως ζωοτροφή ή λίπασμα (34,35).

1.1.3.1. Χαρακτηριστικά των στεμφύλων

Στα στέμφυλα περιέχονται περισσότερες από 500 χημικές ουσίες, όπως σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), οργανικά και ανόργανα οξέα, νερό (η συγκέντρωσή του καθορίζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των στεμφύλων), αρωματικές και αζωτούχες ενώσεις. Η πιο σημαντική κατηγορία χημικών ενώσεων που απαντάται στα στέμφυλα, ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση, είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (36).

Τα στέμφυλα χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές, βιοδραστικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (37–40). Αυτές οι πολυφαινόλες που περιέχονται στα στέμφυλα έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την τοξικότητα που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν την οξειδωτική βλάβη των βιολογικών μακρομορίων. Επιπλέον, συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα των ζωικών οργανισμών, αυξάνοντας τα επίπεδα σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, ενισχύοντας έτσι το ανοσοποιητικό τους σύστημα (34). Τα στέμφυλα λοιπόν, μπορούν να αποτελέσουν μια φθηνή πηγή αντιοξειδωτικών πολυφαινολών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων με υψηλή προστιθέμενη αξία (41).

1.1.3.2. Περιβαλλοντικά προβλήματα από τα στέμφυλα

Τα στέμφυλα λόγω του όγκου και του οργανικού φορτίου, αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, αφού κατά την οινοποίηση παράγεται μεγάλος όγκος στερεών αποβλήτων που αποτελεί το 17% του βάρους των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Στην Ελλάδα οινοποιούνται ανά έτος περίπου 650.000 τόνοι σταφυλιών, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου όγκου στεμφύλων που απορρίπτονται ανεξέλεγκτα και χωρίς καμία επεξεργασία στο περιβάλλον. Έτσι αυτό το παραπροϊόν παραμένει αναξιοποίητο, εκτός από ένα μικρό ποσοστό που χρησιμοποιείται ως λίπασμα ή ζωοτροφή εξ' αιτίας της ενδιαφέρουσας βιολογικής τους δράσης (35). Τα στέμφυλα περιέχουν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών, με αποτέλεσμα το οργανικό τους φορτίο να επιβαρύνει τα γειτονικά οικοσυστήματα. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των στεμφύλων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολικών ενώσεων οδηγούν στην υποβάθμιση του φυσικού περιβάλλοντος (Εικόνα 1) (34). Χαρακτηρίζεται από βιολογικές ιδιότητες

(αντιμικροβιακές, φυτοτοξικές) που περιορίζουν τη δράση μικροοργανισμών που μετέχουν στη βιοαποικοδόμηση.

Η ανεξέλεγκτη εναπόθεση των στεμφύλων στο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει φυτοτοξικότητα με επιπτώσεις:

- στην ανάπτυξη των γύρω φυτών
- στη ρύπανση των γειτονικών υδάτινων οικοσυστημάτων
- στους ζωντανούς οργανισμούς που αυτών των οικοσυστημάτων

Παρ' όλα αυτά, τελευταία έχει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες που περιέχονται στα στέμφυλα παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες και είναι χρήσιμες για τη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων (42).



Εικόνα 1. Εναπόθεση στεμφύλων στο περιβάλλον

1.2. Η ελιά

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα αειθαλές δένδρο το οποίο φτάνει τα 3 – 5 m ύψος, αποτελεί το καλλιεργήσιμο είδος της ελιάς και ευδοκμεί κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου, την Ασία και την Αφρική. Η οικογένεια της ευρωπαϊκής ελιάς περιλαμβάνει πλήθος ποικιλιών οι οποίες χωρίζονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την χρήση των καρπών της (43):

- Επιτραπέζιες ποικιλίες ή βρώσιμες που παράγουν καρπό για επιτραπέζια κατανάλωση (π.χ. Καλαμών, Βασιλικάδα, Καρυδολιά).

- Ελαιοποιήσιμες ποικιλίες, που παράγουν καρπό για την παραγωγή ελαιολάδου (π.χ. Κορωνέικη, Λιανολιά Κέρκυρας, Μαυρελιά).
- Διπλής χρήσεως ποικιλίες, που παράγουν καρπό και για τους δυο σκοπούς (π.χ. Θρουμπολία, Μεγαρείτικη κ.ά.).

Η καλλιέργεια της ελιάς απαιτεί χρόνο, καθώς η πρώτη αποδοτική παραγωγή υπολογίζεται μετά από 8 με 10 χρόνια. Υπάρχουν όμως και ποικιλίες που δίνουν εξαιρετική παραγωγή σε 4 με 6 χρόνια. Ο καρπός της ελιάς αρχίζει να ωριμάζει περί τα μέσα του φθινοπώρου, όπου και γίνεται η συγκομιδή του και στη συνέχεια, σιγά-σιγά ο καρπός αρχίζει να μαυρίζει μέχρι το Δεκέμβρη οπότε και συλλέγονται, είτε για κατανάλωση είτε για την παραγωγή ελαιόλαδου (43,44). Η απόδοση του ελαιόδεντρου είναι ουσιαστικά διετής, δηλαδή τον ένα χρόνο το δέντρο μεγαλώνει και τον άλλο δίνει καρπό. Παρόλα αυτά, μεγαλύτερες ποσότητες ελαιόλαδου και αποβλήτων παράγονται ετησίως. Αυτή η ιδιομορφία στην καλλιέργεια της ελιάς αρχικά οφείλεται σε βιολογικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του δένδρου, και λιγότερο στις ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στη λεκάνη της Μεσογείου. Παρόλα αυτά, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στις μεθόδους καλλιέργειας τα τελευταία 30 χρόνια, η οποία στόχο είχε τη βελτίωση της παραγωγής, όμως η ασταθής παραγωγή και η ολοένα μεγαλύτερη ζήτησή της στην αγορά, παραμένουν ακόμη πρόβλημα. Ο καρπός της ελιάς περιέχει ένα κουκούτσι το οποίο αποτελείται από 30% λιπίδια, 20% υδατάνθρακες και 50% νερό (44).

1.2.1. Η ιστορία και οι θεραπευτικές ιδιότητες της ελιάς και του ελαιολάδου

Η ελιά και το ελαιόλαδο αποτελούν από την αρχαιότητα αναπόσπαστο κομμάτι της πολιτιστικής κληρονομιάς των μεσογειακών χωρών και δή της Ελλάδας, που καλλιεργούνται ήδη από την 8^η χιλιετία π.Χ. Για χρόνια, καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή του ελαιολάδου αποτελούσε την παραδοσιακή αγροτική βιομηχανία των χωρών της Μεσογείου, όπως η Ισπανία, η Ιταλία, η Τυνησία και η Πορτογαλία, οι οποίες σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών είναι μεταξύ των κορυφαίων παραγωγών ελαιολάδου παγκοσμίως (FAOSTAT). Με βάση την ίδια πηγή, η Ελλάδα είναι υπεύθυνη για τη μέση ετήσια παραγωγή 344.615 τόνων ελαιολάδου (1993-2014), και βρίσκεται στην τρίτη θέση της κατάταξης των χωρών παραγωγής ελαιολάδου.

Σύμφωνα με την οδηγία για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης (IPPC), οι ευρωπαϊκές βιομηχανίες παράγουν το 72% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (συγκεκριμένα Ισπανία: 45%, Ιταλία: 15%, Ελλάδα: 10%) (45). Η εξόρυξη και η παραγωγή ελαιολάδου στην Ελλάδα διεξάγεται σε περίπου 2.800 αγροβιομηχανικές μονάδες μικρής κλίμακας διάσπαρτες σε ολόκληρη τη χώρα (46,47).

Στην αρχαία Ελλάδα, η ελιά υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς. Πατρίδα της, σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από τη θεά Αθηνά στην Ακρόπολη. Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιέργησε την ελιά στον ευρωπαϊκό μεσογειακό χώρο και υπάρχουν πολλές παραστάσεις και απεικονίσεις της ελιάς και του ελαιόδεντρου σε μύθους και κουλτούρα των λαών της Μεσογείου. Για τους αρχαίους Έλληνες, η ελιά αποτελούσε σύμβολο ολυμπιακών ιδεωδών, ειρήνης, σοφίας και νίκης, γι' αυτό και σαν έπαθλο στους Ολυμπιονίκες δίνονταν ένα στεφάνι πλεγμένο με κλαδί ελιάς, τον «κότινο».

Η ελιά και ο καρπός της έχουν κρίσιμο ρόλο τόσο στον τομέα της Μεσογειακής διατροφής όσο και της ιατρικής επιστήμης. Ακόμη από το 4.000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιόλαδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο Όμηρος είχε παρομοιάσει το ελαιόλαδο με «χρυσό ύδωρ» και πολλοί γιατροί της αρχαιότητας όπως ο Ιπποκράτης είχαν αναφερθεί στις ευεργετικές και θεραπευτικές του ιδιότητες. Οι χρήσεις του ελαιόλαδου στην αρχαιότητα ήταν ποικίλες. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνταν για την επούλωση πληγών, για τη θεραπεία της αυπνίας, της ναυτίας και της χολέρας, καθώς και σαν καλλυντικό. Στα βιβλία του ο Ιπποκράτης αναφέρονταν σε πάνω από 60 θεραπευτικές χρήσεις του ελαιόλαδου. Στη σύγχρονη έρευνα οι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι το ελαιόλαδο δρα ευεργετικά στη λειτουργία του εγκεφάλου, της καρδιάς και άλλων οργάνων, προστατεύοντας από ασθένειες όπως το έμφραγμα (43,48,49).

Πλέον η Ελλάδα έχει γίνει μια από τις πιο σημαντικές χώρες που συμβάλλουν στην παγκόσμια εξαγωγή της ελιάς και των προϊόντων της.

1.2.2. Παραπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου

Κατά την κατεργασία του ελαιόκαρπου, εκτός από το 20% που παράγεται και είναι ελαιόλαδο, το υπόλοιπο 80% είναι υποπροϊόντα όπως ο ελαιοπυρήνας που αποτελείται

από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού, τα ελαιόφυλλα (30%) και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) (50%), τα οποία είναι σημαντικά σε όγκο και οργανικό φορτίο, γνωστά και με τις ονομασίες «κατσίγαρος», «λιοζούμι» ή «μούργα» (43,46,47). Τα ΥΑΕ παράγονται από την αραιώση της ελαιοζύμης με νερό, από το πλύσιμο του ελαιόκαρπου, των διαφόρων μηχανημάτων και ολόκληρου του περιβάλλοντα χώρου των ελαιοτριβείων, με αποτέλεσμα να περιέχουν τα φυτικά υγρά του ελαιόκαρπου και τα νερά που προστίθενται σε αυτά κατά την διαδικασία της παραλαβής του ελαιόλαδου στο ελαιοτριβείο (43). Τα ΥΑΕ παράγονται κυρίως από φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων και προέρχονται από το υγρό κλάσμα του χυμού του ελαιόκαρπου και του νερού που προστίθενται στην πλύση του, τη μάλαξη και τη φυγοκέντρωση κατά το διαχωρισμό για την παραγωγή ελαιολάδου (50).

1.2.3. Τύποι ελαιοτριβείων

Η επεξεργασία του ελαιολάδου παλαιότερα λάμβανε χώρα σε μονάδες μικρής κλίμακας, οι οποίες στην Ελλάδα ήταν πολλές και διάσπαρτες (46). Πλέον σήμερα γίνεται εφαρμογή δυο βασικών τεχνολογιών εξαγωγής ελαιολάδου όπου εφαρμόζεται μηχανική έκθλιψη-ομογενοποίηση και ακολουθείται δυο ή τριών φάσεων φυγοκεντρικός διαχωρισμός παραλαβής του. Υπάρχουν δυο τρόποι επεξεργασίας του καρπού της ελιάς για την παραλαβή λαδιού, με πιο διαδεδομένο τα φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία τριών φάσεων έναντι των φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων δύο φάσεων. Τελευταία στην Ελλάδα επικρατεί η λειτουργία των 3-φασικών ελαιοτριβείων.

Τα δυο αυτά συστήματα διαφέρουν ως προς τις μεθόδους επεξεργασίας του ελαιοκάρπου και ως προς το ποσό των ΥΑΕ που παράγουν.

1.2.3.1. Τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία

Η διαδικασία των 3-φασικών φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων είναι μια συνεχής διαδικασία από την οποία ως τελικά προϊόντα παράγονται το ελαιόλαδο, ο ελαιοπυρήνας και τα ΥΑΕ. Για την παραλαβή του ελαιολάδου γίνεται αραιώση της ελαιοζύμης με μεγάλη ποσότητα νερού με αποτέλεσμα τα τριφασικά ελαιοτριβεία να παράγουν μεγάλες ποσότητες ΥΑΕ.

Από 1000 kg ελαιοκάρπου παράγονται περίπου 500 kg ελαιοπυρήνα και 1200 kg ΥΑΕ. Για κάθε 1 λίτρο ελαιολάδου που παράγεται σε φυγοκεντρικό ελαιοτριβείο τριών φάσεων, εξάγονται περίπου 2,5 λίτρα αποβλήτου (51). Σημαντικό είναι το στοιχείο που έχει προκύψει, ότι η ετήσια παραγωγή ΥΑΕ ενός 3φασικού ελαιοτριβείου μπορεί να αντιστοιχηθεί με την ποσότητα παραγωγής αποβλήτων μιας πόλης 30.000 κατοίκων. Βασικό λοιπόν μειονέκτημα των τριφασικών ελαιοτριβείων είναι οι μεγάλες ποσότητες ύδατος που πριστίθενται κατά τη διαδικασία, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ΥΑΕ και άρα την περιβαλλοντική ρύπανση που προκαλείται από αυτά.

1.2.3.2. Διφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία

Η διαδικασία των 2-φασικών φυγοκεντρικών ελαιοτριβείων είναι και αυτή μια συνεχής διαδικασία από την οποία σαν τελικά προϊόντα είναι το ελαιόλαδο και μείγμα στερεών αποβλήτων (ελαιοπυρήνας) με υγρασία περίπου μεγαλύτερη από 60-65%. Στα διφασικά ελαιοτριβεία, για την παραλαβή του ελαιολάδου δεν καταναλώνεται ποσότητα νερού, δηλαδή δεν προστίθεται νερό για την αραιώση της ελαιοζύμης. Αποτελούν την πιο πρόσφατη και εξελιγμένη μέθοδο παραγωγής ελαιολάδου και είναι σαφώς πιο οικολογική, αφού μειώνονται οι ανάγκες χρήσης νερού για τη λειτουργία τους, αλλά και οι ποσότητες των ΥΑΕ.

Από 1000 kg ελαιοκάρπου που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λαδιού, τα διφασικά ελαιοτριβεία παράγουν 800 kg αποβλήτων, έναντι των 1200 kg που παράγουν τα τριφασικά.

Συνοπτικά, το κύριο μειονέκτημα των τριφασικών ελαιοτριβείων είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή σημαντικού όγκου ΥΑΕ που ευθύνονται για τη ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα. Από την άλλη, το κύριο μειονέκτημα των διφασικών ελαιοτριβείων είναι η δύσκολη διαχείριση των στερεών αποβλήτων που προκύπτουν, λόγω του υψηλού ποσοστού σε υγρασία. Στην Ελλάδα ο πιο διαδεδομένος τύπος ελαιοτριβείων είναι τα τριφασικά φυγοκεντρικά ελαιοτριβεία (43).

1.2.4. Τα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

Οι μεσογειακές χώρες είναι υπεύθυνες για το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (47). Στην Ελλάδα, η εξόρυξη και η παραγωγή ελαιολάδου διεξάγεται σε περίπου 2.400 μικρής κλίμακας αγροβιομηχανικές μονάδες διασκορπισμένες σε ολόκληρη τη χώρα. Αυτές οι διεργασίες παράγουν δύο ρεύματα αποβλήτων: τα υπολείμματα στερεού ελαιοπυρήνα και τα ΥΑΕ. Τα ΥΑΕ σχηματίζονται από την περιεκτικότητα σε νερό του ίδιου του καρπού και του νερού που χρησιμοποιείται για την πλύση και την επεξεργασία τους, και ανέρχεται σε 0,5-3,25 m³ ανά 1.000kg ελιές (52). Συνήθως, τα ΥΑΕ αποτελούνται από νερό, οργανικά και μεταλλικά άλατα. Περιλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες οργανικής ύλης (π.χ. λίπη, λιπίδια, πολυφαινόλες), ανόργανα συστατικά και νερό. Ένα μέρος του οργανικού κλάσματος των ΥΑΕ αποτελείται από φαινόλες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα, την έντονη οσμή, την τοξικότητα, τη φυτοτοξικότητα και τις αντιβακτηριακές ιδιότητες (46,47,53).

Εκτιμάται ότι περίπου 30 εκατομμύρια κυβικά μέτρα ΥΑΕ παράγονται ετησίως στη λεκάνη της Μεσογείου (54). Η απόρριψη των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου μπορεί να προκαλέσει σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως ρύπανση του εδάφους, ρύπανση υδάτινου όγκου, υπόγεια διέλευση και δυσάρεστη οσμή (55). Τα περιβαλλοντικά προβλήματα και οι πιθανοί κίνδυνοι που προκαλεί η ανεξέλεγκτη εναπόθεση των ΥΑΕ στα υδάτινα οικοσυστήματα έχουν ωθήσει πολλές χώρες να περιορίσουν την παραγωγή και την απόρριψή τους (46,47). Στόχο αποτελεί η Οδηγία 2006/12/ΕΚ «Προστασία της υγείας του ανθρώπου και του περιβάλλοντος από τις επιβλαβείς επιδράσεις που προκαλούνται από τα ΥΑΕ (συγκέντρωση, μεταφορά, επεξεργασία, εναποθήκευση, απόθεση)». Τα τελευταία χρόνια, έχει διερευνηθεί πληθώρα νέων τεχνολογιών για τη μείωση του ρυπογόνου φορτίου των ΥΑΕ (π.χ. φυσικοχημικές και βιολογικές μέθοδοι) (46,47,53). Έχουν προταθεί τεχνολογίες, οι οποίες όμως χαρακτηρίζονται από υψηλό λειτουργικό κόστος και συχνά απαιτούν πολύπλοκη συντήρηση και έμπειρο προσωπικό για τη διαχείρισή τους (56). Έτσι, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ακόμη μια περιβαλλοντικά ασφαλής και οικονομικά αποδοτική μέθοδος για την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών προβλημάτων επαγόμενη από τα ΥΑΕ (53,57).

1.2.4.1. Χαρακτηριστικά των ΥΑΕ

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου είναι λύματα με υψηλό οργανικό περιεχόμενο. Τα ΥΑΕ παράγονται σε μικρές ποσότητες και απορρίπτονται σε διάσπαρτα σημεία απαιτώντας ακόμη πιο αποτελεσματική διαχείριση (58). Τα ΥΑΕ περιέχουν φαινολικές ενώσεις με τη μορφή μονοκυκλικών και πολυμερικών αρωματικών μορίων. Αυτά τα πολυφαινολικά συστατικά τους είναι υπεύθυνα για το σκούρο καφέ τους χρώμα, τα φυτοτοξικά αποτελέσματα και την αντιβακτηριακή τους δράση (58). Η σύνθεση των ΥΑΕ είναι μεταβλητή και πολύπλοκη, συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολών και των τανινών, οι οποίες δεν είναι εύκολα αποικοδομήσιμες ουσίες (58,59). Επιπλέον, τα ΥΑΕ αποτελούνται από 83-94% νερό, 4-16% οργανικές ενώσεις και 0.4-2.5% μεταλλικά άλατα, κατά βάρος. Συνολικά, το 2-15% του οργανικού κλάσματος αποτελείται από φαινολικές ενώσεις με συγκέντρωση 3-10 g/l. Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) είναι ιδιαίτερα υψηλό, και κυμαίνεται μεταξύ 45 και 220 g/l. Ομοίως, υψηλό είναι και το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD), που κυμαίνεται μεταξύ 35 και 100 g/l, ενώ το pH των ΥΑΕ είναι όξινο (4,0 έως 5,0) (47,58,60,61).

1.2.4.2. Περιβαλλοντικά προβλήματα από τα ΥΑΕ

Η άμεση επίπτωση των ΥΑΕ στο περιβάλλον είναι αφενός η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του (φυσικές χρωστικές ουσίες με χαρακτηριστική άσχημη οσμή) και αφ' ετέρου, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει φαινόμενα ευτροφισμού σε περιπτώσεις που καταλήγει σε υδάτινους αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους και λίμνες). Τα ΥΑΕ, αν και αποτελούν υποπροϊόντα επεξεργασίας του καρπού της ελιάς, συγκαταλέγονται στα επικίνδυνα, από πλευράς ρυπαντικού φορτίου, γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα (43,47).

Πιο συγκεκριμένα τα ΥΑΕ προκαλούν:

- συνθήκες ευτροφισμού (μείωση διαλυμένου οξυγόνου στο νερό)
- τοξικά φαινόμενα στην υδρόβια πανίδα
- διάβρωση εδάφους (δεν επιτρέπουν τη γεωργική εκμετάλλευση)
- ρύπανση θαλάσσιων οικοσυστημάτων

➤ προβλήματα σε άλλους οικονομικούς κλάδους

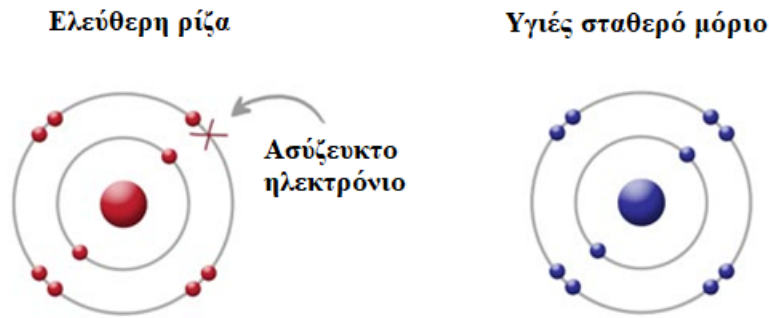
Η συνήθης διαχείριση των ΥΑΕ είναι η διάθεσή τους σε υδάτινους αποδέκτες (ρεματιές, ποτάμια, λίμνες, θάλασσες) με ή χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, με αποτέλεσμα την περιβαλλοντική υποβάθμιση γύρω από τις εγκαταστάσεις των ελαιοτριβείων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Εναπόθεση ΥΑΕ στο υδάτινο περιβάλλον

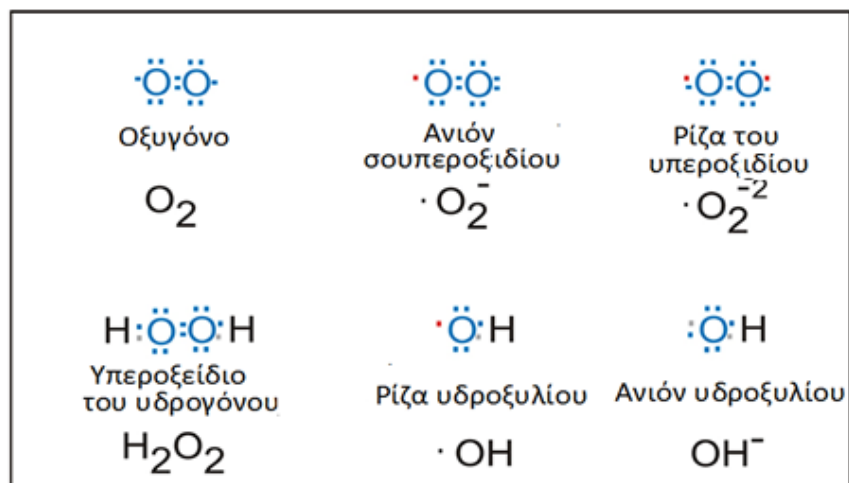
1.3. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (62–64). Είναι μόρια πολύ ασταθή, δηλαδή έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, αφού τείνουν να απομακρύνουν ηλεκτρόνια από τα βιομόρια, όπως DNA, λιπίδια ή πρωτεΐνες ώστε να συμπληρώσουν τη στοιβάδα σθένους τους (63,65). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια-στόχοι να μετατρέπονται τα ίδια σε ρίζες, οδηγώντας έτσι στην έναρξη αλυσιδωτής αντίδρασης με τελικό αποτέλεσμα τη βλάβη των κυττάρων (63) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Δομή ελευθέρων ριζών

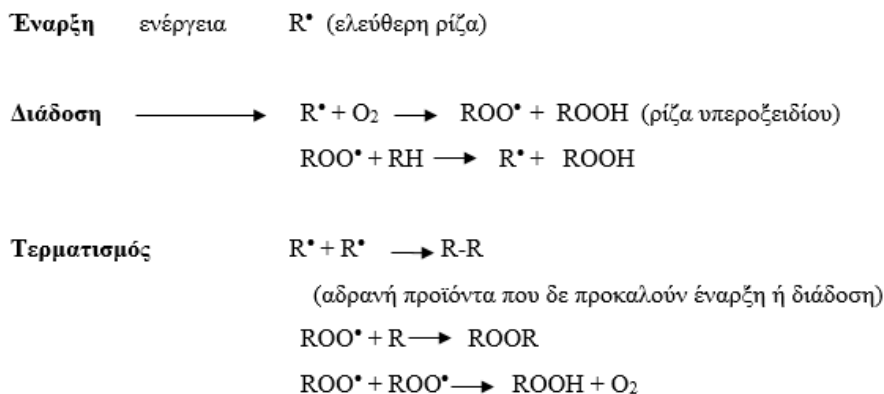
Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, μπορούν να παραχθούν και ως συνέπεια άλλων κυτταρικών διεργασιών (π.χ. δράση ανοσοποιητικού συστήματος) ή εξωτερικών παραγόντων (άσκηση, έκθεση σε τοξικούς παράγοντες κλπ.) (66). Αυτά τα μόρια που έχουν το οξυγόνο ως κεντρικό άτομο, ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και την υδροξυλική ρίζα (HO^{\cdot}). Επιπλέον, στις ROS ανήκουν και μη ριζικά παράγωγα, όπως το υπεροξίδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Εικόνα 4). Όμως, εκτός των ROS, υπάρχουν και ελεύθερες ρίζες με διαφορετικά κεντρικά άτομα, όπως το άζωτο, έχοντας παρεμφερή τρόπο δράσης και οι δυο δραστικές μορφές. Αντίστοιχα οι ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο, ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS), όπως είναι το μονοξίδιο (NO^{\cdot}) και το διοξίδιο (NO_2^{\cdot}) του αζώτου (67,68).



Εικόνα 4. Ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο

1.3.1. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών

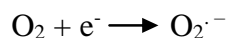
Η δράση τους διακρίνεται σε τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Μια ελεύθερη ρίζα παράγεται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου, αντίδραση που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (69). Στη συνέχεια, στο στάδιο της διάδοσης, νέα ρίζα παράγεται από αλληλεπίδραση αυτής της ρίζας με ουδέτερο μόριο.



1.3.2. Είδη ελευθέρων ριζών

1.3.2.1. Ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$)

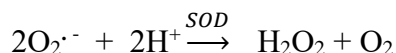
Η ρίζα του σουπεροξειδίου προέρχεται από το οξυγόνο ύστερα από την αναγωγή του με ένα ηλεκτρόνιο:



Η παραγωγή της οφείλεται κυρίως στην ατελή αναγωγή του O_2 σε H_2O κατά τη διάρκεια της αναπνευστικής αλύσου στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Εξ' αιτίας του γεγονότος ότι το $O_2^{\bullet -}$ είναι αρνητικά φορτισμένο, δεν είναι εφικτό να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη (66). Εκτός από την αναπνευστική αλύσο η ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου είναι δυνατόν να παραχθεί και από τη δραστηριότητα ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η NADPH οξειδάση, η κυκλοξυγενάση και η λιποξυγενάση. Ειδικότερα, σε κατάσταση φλεγμονής, όσον αφορά την NADPH οξειδάση, παράγονται μεγάλες ποσότητες σουπεροξειδίου σαν αντίδραση του οργανισμού στην εισβολή μικροοργανισμών, διαδικασία γνωστή ως «αναπνευστική έκρηξη» (70).

1.3.2.2. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το H_2O_2 είναι εν δυνάμει ρίζα, καθώς δεν εμφανίζει δραστικότητα *per se*, όμως μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ρίζας υδροξυλίου, που είναι ιδιαίτερα δραστική και πολύ τοξική για τους κυτταρικούς οργανισμούς. Σχηματίζεται μέσω του ενζύμου της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), όπως φαίνεται στην αντίδραση (71):



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι μία σταθερή ένωση, δηλαδή έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με τις υπόλοιπες ROS, και διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη λόγω έλλειψης φορτίου. Η κυτταροτοξικότητα του H_2O_2 αφορά τη συμμετοχή του στην αντίδραση Fenton, που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (72), παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



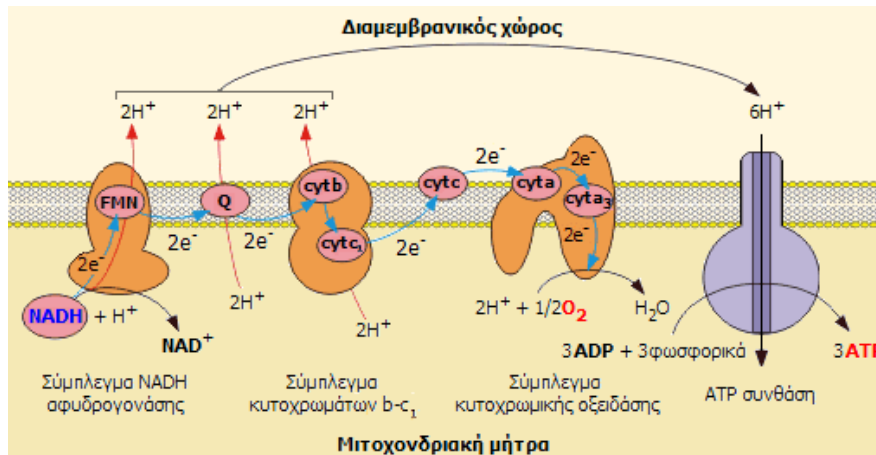
1.3.2.3. Ρίζα Υδροξυλίου (HO^{\cdot})

Αποτελεί την πλέον δραστική μορφή ελεύθερης ρίζας με κεντρικό άτομο οξυγόνου, εξ' αιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής της (73,74). Όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να παραχθεί μέσω της αντίδρασης Fenton από αλληλεπίδραση ενός μετάλλου μετάπτωσης που δρα καταλυτικά (όπως ο δισθενής σίδηρος ή ο μονοθενής χαλκός) με το H_2O_2 (63). Αυτή η ρίζα είναι εξαιρετικά δραστική, αφού αλληλεπιδρά με οποιοδήποτε γειτονικό κυτταρικό μακρομόριο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια), προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες (66).

1.3.3. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.3.3.1. Αναπνευστική αλυσος - Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ελεύθερες ρίζες και μάλιστα εκείνες με κέντρο το οξυγόνο παράγονται κατά το μεταβολισμό όλων των αερόβιων οργανισμών. Κυριότερος μηχανισμός είναι η ατελής αναγωγή του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανιόντος σουπεροξειδίου (75). Οι αερόβιοι οργανισμοί στηρίζονται σε μεγάλο βαθμό στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας. Αυτή η διαδικασία γίνεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, όπου δημιουργείται διαβάθμιση πρωτονίων κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από μόρια NADH με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο (Εικόνα 5).



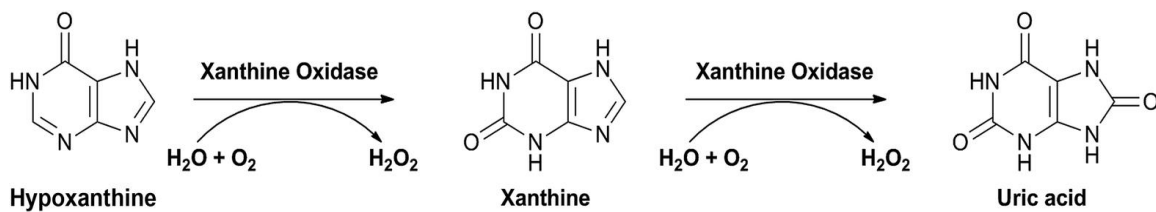
Εικόνα 5. Αναπνευστική αλυσός

Η γλυκόλυση και ο κύκλος του κιτρικού οξέος παράγουν μόρια NADH και FADH_2 επιφορτισμένα με ένα ζεύγος ηλεκτρονίου υψηλού δυναμικού μεταφοράς. Τα ηλεκτρόνια αυτά παραλαμβάνονται από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, τα οποία με τη σειρά τους, ανάγουν το O_2 σε H_2O . Παρ' όλα αυτά, η διαδικασία είναι ατελής, με συνέπεια ένα μέρος του οξυγόνου να ανάγεται σε O_2^- (76).

1.3.3.2. Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (XO)

Σε φυσιολογικά περιβάλλοντα, η XO βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα διότι η κύρια μορφή της είναι η *αφυδρογονάση της ξανθίνης*. Όταν η ξανθίνη μετατρέπεται σε ουρικό οξύ, καταλύεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης και δεν παράγονται ελεύθερες ρίζες. Όμως σε καταστάσεις επαναιμάτωσης μετά από ισχαιμία, η αφυδρογονάση πρωτεολύεται μερικώς και επάγεται η δημιουργία της οξειδάσης της ξανθίνης. Κατά την ισχαιμία τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται σε σημαντικό βαθμό, αλλά με την επαναιμάτωση, το οξυγόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την οξειδάση η οποία αφ' ενός παράγει το ουρικό οξύ, ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος, και ταυτόχρονα οδηγεί στην παραγωγή ROS ως παραπροϊόντα, λόγω διαφοράς στον μηχανισμό κατάλυσης της (77–79) (Εικόνα 6). Η οξειδάση της ξανθίνης αν και κυτταροπλασματικό ένζυμο, μπορεί να εμφανιστεί και στην κυκλοφορία, με ικανότητα

προσκόλλησης στα τοιχώματα των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα αύξηση παραγωγής των ROS, που μπορεί να συσχετιστεί με καρδιαγγειακές παθήσεις (80).



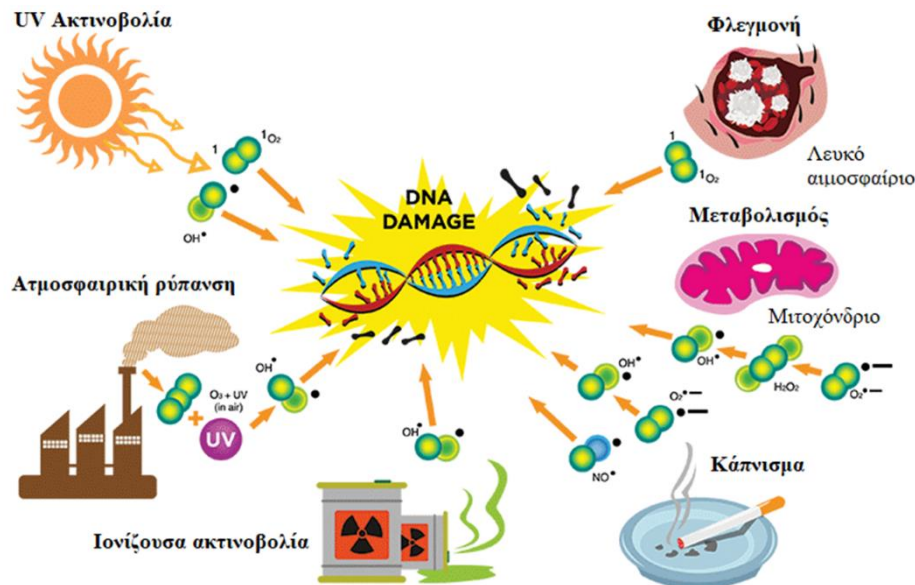
Εικόνα 6. Παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της οξειδάσης της ζανθίνης

1.3.3.3. Φλεγμονή

Αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η φλεγμονώδης αντίδραση μετά την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών προκαλεί τη συσσώρευση μακροφάγων. Τα μακροφάγα έχουν στην πρωτεϊνική τους μεμβράνη την NADPH οξειδάση, που σε περιβάλλον φλεγμονής μπορεί να ενεργοποιηθεί και να παράξει ROS με σκοπό την καταστροφή των εισβολέων. Αυτό θεωρείται πυλώνας της ενδογενούς άμυνας (81).

1.3.4. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξωγενών πηγών παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, έκθεση η οποία προκαλεί εκτεταμένες βλάβες στο δέρμα και τα μάτια. Κάπνισμα, αλκοόλ, στρες και επαφή με ξеноβιοτικές ουσίες (απόβλητα βιομηχανιών, φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα) οδηγούν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών (82) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

1.3.5. Βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών

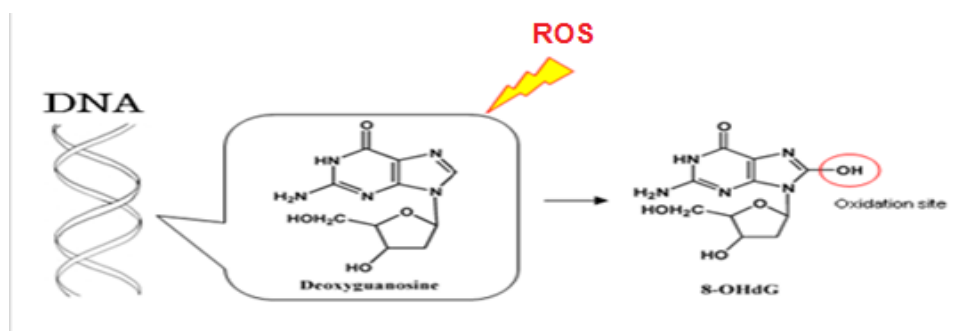
Οι ελεύθερες ρίζες παρότι προκαλούν βλάβες στην υγεία, εντούτοις συμμετέχουν και σε ένα πλήθος φυσιολογικών οξειδοαναγωγικών διεργασιών των οργανισμών. Στο πλαίσιο αυτό, στους αερόβιους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί πολλοί μηχανισμοί που εκμεταλλεύονται τις ελεύθερες ρίζες για τη μεταγωγή σήματος, τον πολλαπλασιασμό, την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στο ανοσοποιητικό σύστημα, συνεισφέροντας στην ομοιόσταση των κυττάρων και ολόκληρου του οργανισμού.

Η αλληλεπίδραση ενός οργανισμού με τις ελεύθερες ρίζες διέπεται από το φαινόμενο της όρμησης (hormesis), δηλαδή όταν ένα ερέθισμα είναι σε χαμηλή συγκέντρωση έχει ευεργετική επίδραση. Όταν όμως η συγκέντρωση αυτή υπερβεί μια

ουδό (που διαφέρει ανάλογα με το κάθε ερέθισμα-ένωση), τότε προκαλούνται βλάβες στα βιομόρια (83).

Όταν οι ελεύθερες ρίζες είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις (ή όταν ανεπαρκούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού), αυτές αλληλεπιδρούν με κυτταρικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) αλλοιώνοντας τη δομή τους ή καταστρέφοντάς τα. Οι ελεύθερες ρίζες και γενικά το χρόνιο οξειδωτικό στρες, (κατάσταση που τα οξειδωτικά μόρια υπερέχουν των αντιοξειδωτικών), συσχετίζονται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων όπως καρκίνο, διαβήτη, καρδιαγγειακές ασθένειες, νευροεκφυλιστικές νόσους και γήρανση (84–89).

Σε κάθε κυτταρικό μακρομόριο, τα λιπίδια είναι περισσότερο ευάλωτα στην οξείδωση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ δραστικών μορφών και λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες οδηγεί στο σχηματισμό των άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων, τα οποία διασπώνται δίνοντας ρίζες περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) και μαλονδιαλδεΐδη (MDA). Επομένως, η υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλεί αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητάς της με επακόλουθο την κυτταρική απόπτωση (63,90). Στις πρωτεΐνες, η οξείδωσή τους οδηγεί στο σχηματισμό των αντίστοιχων καρβονυλίων (91). Τα τέσσερα κύρια αμινοξέα που καρβονυλιώνονται είναι η προλίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη (92,93). Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, η προσθήκη δηλαδή μιας καρβονυλικής ομάδας ($\text{C}=\text{O}$), είναι μια μη αναστρέψιμη βλάβη, αφού η πρωτεΐνη χάνει τη λειτουργία της, δεν μπορεί να διασπαστεί και συσσωματώνεται (91,93). Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλλοιώσουν τις βάσεις του DNA και να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, αλλά και έμμεσα να οξειδώσουν τις πρωτεΐνες του συστήματος επιδιόρθωσης (89) (Εικόνα 8).



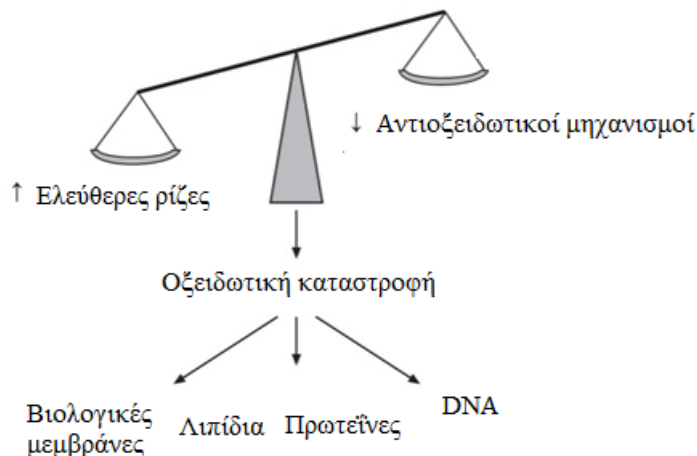
Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση της γουανίνης του DNA με ROS που οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυδεογουανωσίνης (8-OHdG).

1.4. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Sies για να περιγράψει την κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων (94,95) (Εικόνα 9). Εξαρχής, το οξειδωτικό στρες θεωρήθηκε ως ένα επιβλαβές για τον οργανισμό φαινόμενο, αφού έχει συσχετιστεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Σχετικές ελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με την καλή διαβίωση των ζώων (96,97). Θεωρείται ως η αιτία αρκετών ασθενειών όπως μικροβιακές λοιμώξεις, θερμικό στρες και στρες που προκαλείται από τη μεταχείρισή τους, που επηρεάζουν την ανάπτυξη των πουλερικών (98). Επιπροσθέτως, κοινές ασθένειες όπως πνευμονία, εντερίτιδα, μαστίτιδα, σήψη, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης (46,99–101).

Παρ' όλα αυτά, τελευταία υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό στρες δημιουργείται και φυσιολογικά στον οργανισμό, αλλά παροδικά, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης (83,94). Επάγει την αυτοφαγία, δηλαδή την ανακύκλωση κυτταρικών μακρομορίων που έχουν υποστεί βλάβες, και να προκαλέσει επαγωγή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου (102). Σε παρατεταμένο οξειδωτικό στρες προκαλούνται εκτεταμένες βλάβες με αποτέλεσμα κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης (70). Όμως ήπιες βλάβες στο DNA προκαλούν μεταλλάξεις (όχι νέκρωση και απόπτωση) που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (103).

Το οξειδωτικό στρες συμβαίνει, όπως προαναφέρθηκε, όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και ελευθέρων ριζών και μπορεί να οφείλεται είτε σε μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων (παρουσία μετάλλαξης, απουσία συμπαραγόντα, μειωμένη πρόσληψη από τη διατροφή), είτε σε αύξηση των ROS ή RNS (έκθεση σε τοξικούς εξωγενείς παράγοντες ή ενδογενείς μηχανισμούς-άσκηση, φλεγμονή) (104)



Εικόνα 9. Διαταραχή ισορροπίας οξειδοαναγωγικής κατάστασης

1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αφού οι αερόβιοι οργανισμοί παράγουν συνεχώς ελεύθερες ρίζες, έχουν αναπτύξει εξελικτικά πλήθος αντιοξειδωτικών μηχανισμών για να προλαμβάνουν και να επιδιορθώνουν τις οξειδωτικές καταστροφές. *Αντιοξειδωτικό* είναι «κάθε ουσία, μικρής συγκέντρωσης σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα που μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος» (82).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ενός κυττάρου μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες των ελευθέρων ριζών συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (105). Όμως είναι απαραίτητη η διατήρηση κάποιων επιπέδων ελευθέρων ριζών ώστε να λειτουργούν τα οξειδοαναγωγικά σηματοδοτικά μονοπάτια, δηλαδή οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί πρέπει να εξουδετερώνουν μόνο την περίσσεια των παραγόμενων οξειδωτικών μορίων (106).

Τα αντιοξειδωτικά μόρια διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

(α). τα ενζυμικά που είναι αμιγώς ενδογενή και

(β). τα μη ενζυμικά που μπορεί να είναι ενδογενή αλλά και προσλαμβανόμενα από τη διατροφή. Ένα μόριο θεωρείται αντιοξειδωτικό όταν αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας λιγότερο αντιδραστικά προϊόντα από τα αρχικά μόρια.

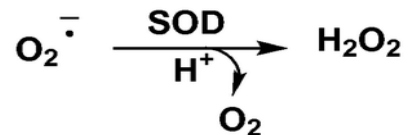
- Αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι: η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) και άλλα.

- Μη ενζυμικά είναι: οι βιταμίνες Α (ρετινόλη), C (ασκορβικό οξύ) και Ε (τοκοφερόλη), οιθειόλες (γλουταθειόνη), οι πολυφαινόλες, το ουρικό οξύ, η φερριτίνη, η χολερυθρίνη και χημικά στοιχεία συμπάροντες σε ορισμένα από τα ανωτέρω ένζυμα (σελήνιο, ψευδάργυρος, σίδηρος, χαλκός και μαγνήσιο).

1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

1.5.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Αυτό το ένζυμο καταλύει τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-) σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξειδίο του υδρογόνου σύμφωνα με την κάτωθι αντίδραση:



Η δισμουτάση παράγεται σε τρεις ισομορφές, μια κυτταροπλασματική, μια μιτοχονδριακή και μια εξωκυτταρική (107,108). Θεωρείται απαραίτητη για την επιβίωση των αερόβιων οργανισμών καθώς είναι η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των οξειδωτικών μορίων.

1.5.1.2. Κατάλαση (CAT)

Πρόκειται για μια τετραμερή αιμοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου προς νερό και μοριακό οξυγόνο (109).



1.5.1.3. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GSH έχει τη δυνατότητα προσφοράς ενός ηλεκτρονίου της σουλφυδρικής ομάδας προς εξουδετέρωση ηλεκτρονιόφιλων μορίων, οδηγώντας ταυτόχρονα στην οξείδωση της ίδιας. Η οξειδωμένη της μορφή (GSSG) αποτελείται από δυο μόρια γλουταθειόνης ενωμένα μέσω δισουλφιδικού δεσμού και είναι ανενεργή. Η

επανενεργοποίηση της προϋποθέτει τη δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), κάνοντας χρήση του NADPH ως δότη ηλεκτρονίων (110).

1.5.1.4. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια σεληνοπρωτεΐνη που καταλύει την μετατροπή της GSH σε GSSG. Απαντάται σε 8 ισομορφές με την πρώτη να είναι η αφθονότερη. Οι περοξειδάσες δρουν προστατευτικά έναντι οξειδωτικών βλαβών μέσω της εξουδετέρωσης υπεροξειδίων, όπως π.χ. τα λιπιδικά υπεροξειδία. Η δραστικότητα της GPx είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της GSH.

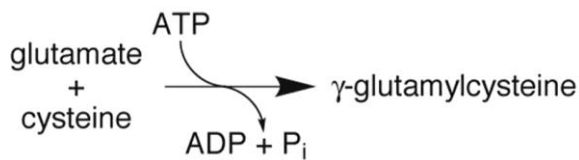
1.5.1.5. Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι μία οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη σύνδεση της GSH με πληθώρα υποστρωμάτων (τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων), οδηγώντας στην αποτοξικοποίηση τους (111). Τοιουτοτρόπως, προστατεύουν τα κυτταρικά μακρομόρια από πιθανές αλληλεπιδράσεις με ηλεκτρονιόφιλα μόρια (112). Οι τρανσφεράσες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον κυτταρικό εντοπισμό τους:

- 1) κυτταροπλασματικές,
- 2) μιτοχονδριακές και
- 3) μικροσωμικές.

1.5.1.6. Λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL)

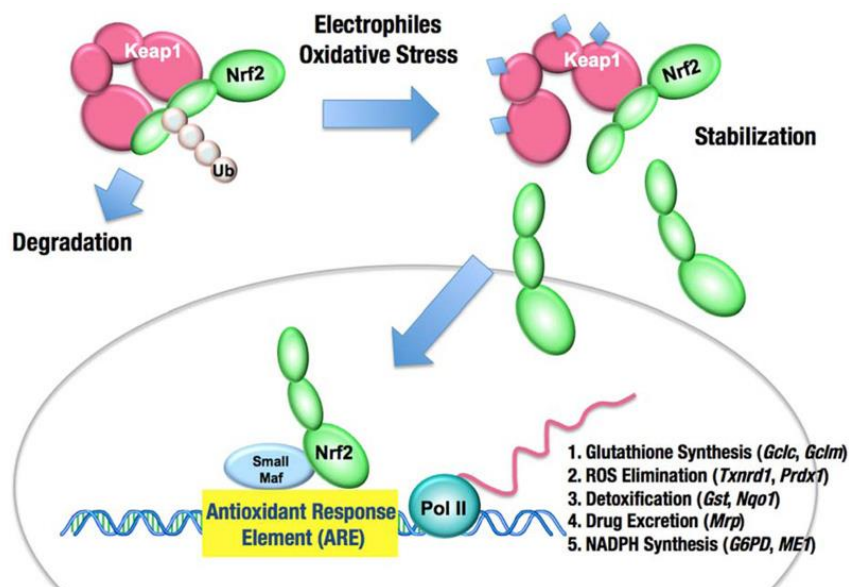
Η γ-GCL καταλύει το πρώτο και ρυθμιστικό βήμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ανηγμένης γλουταθειόνης, όπως φαίνεται παρακάτω:



Πρόκειται για μια ετεροδιμερή πρωτεΐνη που αποτελείται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική υπομονάδα. Οι δυο υπομονάδες κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια (113). Η πλήρης πρωτεΐνη καταλύει τη σύζευξη κυστεΐνης και γλουταμικού με ιδιαίτερο τρόπο, καθώς συνδέονται ομοιοπολικά η αμινομάδα της κυστεΐνης με την καρβοξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού. Κατ' αυτό τον τρόπο, ο συγκεκριμένος δεσμός καθίσταται ανθεκτικός στην ενζυμική πρωτεόλυση. Η ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης της GSH προϋποθέτει την προσθήκη ενός καταλοίπου γλυκίνης μέσω της συνθετάσης της γλουταθειόνης (114).

1.5.1.7. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2)

Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα της κατηγορίας φερμουάρ λευκίνης που ενώ δεν έχει άμεση αντιοξειδωτική δράση, έχει ως γονίδια στόχους πληθώρα αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς είναι καθοριστικός στην απόκριση των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες (115).



Εικόνα 10. Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2

Όταν ένα κύτταρο βρίσκεται υπό φυσιολογικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες, η πλειοψηφία των μορίων Nrf2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύνδεση με την πρωτεΐνη Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Εξ' αιτίας αυτής της σύνδεσης, επάγεται η ουβικιτινίωση και άρα η αποικοδόμηση του Nrf2 από το πρωτεάσωμα (116).

Ο ασυνήθιστα υψηλός αριθμός καταλοίπων κυστεΐνης της Keap1 (η ανθρώπινη πρωτεΐνη έχει 27 κατάλοιπα) την καθιστούν «αισθητήρα» της παρουσίας ηλεκτρόφιλων μορίων (όπως οι ελεύθερες ρίζες) (117). Τοιουτοτρόπως, σε περίπτωση που υπάρξει μεταβολή υπέρ των οξειδωτικών οι κυστεΐνες μπορούν να οξειδωθούν, οδηγώντας σε αλλαγή διαμόρφωσης της Keap1 και κατ' επέκταση στην αποσταθεροποίηση της σύνδεσης με τον Nrf2. Το τελικό αποτέλεσμα αυτού είναι η απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα, η είσοδος του στον πυρήνα όπου θα οδηγήσει [μέσω αλληλεπίδρασης με τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία AREs (Antioxidant Response Elements)] στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα ή βιοσυνθέτουν μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια (Εικόνα 10) (115,118).

1.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τόσο ενδογενή μόρια όσο και εξωγενή τα οποία μπορούν να ληφθούν μέσω της διατροφής.

1.5.2.1. Βιταμίνες C και E

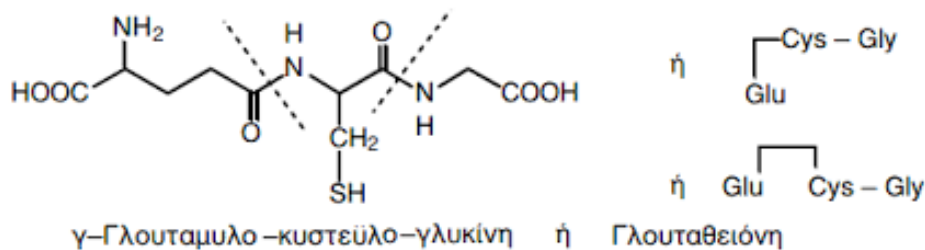
Είναι οι δυο πιο γνωστές βιταμίνες και όπως όλες οι ενώσεις αυτής της ομάδας, λαμβάνονται από τη διατροφή. Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή ενώ οι E λιποδιαλυτές. Και οι δυο εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ λόγω της διαλυτότητας τους παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση (Οι βιταμίνες E λόγω λιποδιαλυτότητας συναντώνται στις κυτταρικές μεμβράνες όπου προστατεύουν από λιπιδική υπεροξειδωση). Η βιταμίνη C είναι ένα από τα σημαντικότερα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά μόρια καθώς μπορεί να εξουδετερώσει δραστικά μόρια μέσω της προσφοράς ηλεκτρονίων. Οι βιταμίνες E (τοκοφερόλες) είναι ένα σύνολο οκτώ ενώσεων με την πλέον δραστική να είναι η α-τοκοφερόλη. (119).

1.5.2.2. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μια τριπεπτιδική (γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη, γλυκίνη) θειόλη, μοριακού βάρους 307 Da και αποτελεί το πιο σημαντικό ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, αφού συναντάται σε όλους τους αερόβιους καθώς και σε κάποιους αναερόβιους οργανισμούς (Εικόνα 11). Το μεγαλύτερο ποσοστό της (~90%)

εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία της είναι καθοριστική στην άμυνα έναντι οξειδωτικών παραγόντων (120,121).

Η υπεροξειδάση και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης οδηγούν σε οξείδωση του τριπεπτιδίου και ταυτόχρονη σύνδεση του (ή προσφορά ηλεκτρονίου του) με άλλα μόρια. Μέσω της GPx εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ηλεκτρόνια, ενώ μέσω των GSTs συμμετέχει στη φάση II του μεταβολισμού ξενοβιοτικών, καθώς τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά (120). Ακόμα, συμβάλλει στην αναγέννηση των βιταμινών C και E.



Εικόνα 11. Δομή της γλουταθειόνης

1.5.2.3. Ουρικό οξύ

Το ουρικό είναι προϊόν καταβολισμού των πουρινών και είναι αξιοσημείωτη η παρουσία του στο πλάσμα, ενώ η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στην αναγωγική του ικανότητα (122).

1.5.2.4. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι φυτικά παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (123). Εντοπίζονται σε όλα τα είδη φυτών, άρα και σε βρώσιμα προϊόντα τους όπως τα λαχανικά, τα φρούτα, τα ροφήματα και οι ξηροί καρποί (124).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία καθώς έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής αρκετές χιλιάδες. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: τις πολυφαινόλες, τις αζωτούχες ενώσεις (αλκαλοειδή) και τα τερπένια (125,126). Εκ των τριων ομάδων, οι πολυφαινόλες είναι η πολυπλυθέστερη με πάνω από 8000 αναγνωρισμένα είδη. Όλες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό έναν αρωματικό δακτύλιο με μία τουλάχιστον υδροξυλομάδα (127). Η πλειοψηφία των πολυφαινολών απαντώνται ως σύμπλοκα άνω του ενός φαινολικού μορίου, όντα έτσι διμερή, oligo- ή πολυμερή. Ένα

ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η συσχέτιση που διαφαίνεται μεταξύ της κατανάλωσης τους και των ευεργετικών επιπτώσεων για την υγεία (128–130).

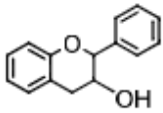
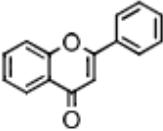
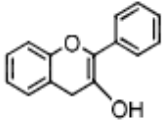
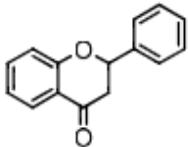
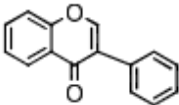
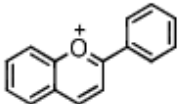
Κατηγορίες Πολυφαινολών

Οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό αρωματικών δακτυλίων και των υποκατεστημένων ομάδων που περιέχουν, και πιο συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες.

1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο καλά μελετημένη υποκατηγορία, καθώς έχουν εντοπιστεί πάνω από 5000 διαφορετικές ενώσεις που χωρίζονται στις φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες (Πίνακας 1). Συχνότερα απαντώνται σε πολυμερή μορφή σε συνδεση με σάκχαρα που οδηγούν σε γλυκοζυλιωμένα παράγωγα. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι οι δύο αρωματικούς δακτύλιους που συνδέονται μέσω ενός οξυγονωμένου πυρανικού δακτυλίου. Μελέτες δείχνουν πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία όπως η μείωση συχνότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου λόγω του γαλλικού παραδόξου (131,132).

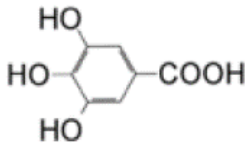
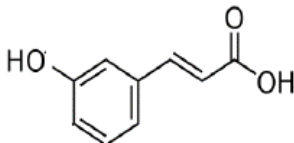
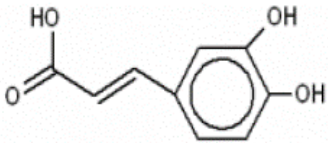
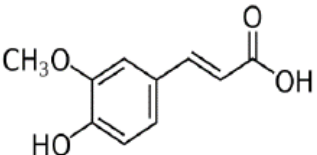
Πίνακας 1. Κατηγορίες Φλαβονοειδών

ΤΑΞΗ	ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ
φλαβανόλη		(+)-κατεχίνη (-)-επικατεχίνη επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος
φλαβόνη		χρυσίνη απιγενίνη ρουτίνη λουτεολίνη γλυκοζίτης της λουτεολίνης
φλαβονόλη		καμπερόλη κερκετίνη μυρισετίνη ταμαριζετίνη
φλαβανόνη		ναριγκινίνη ναριγκενίνη ταξιφολίνη εριοδικτυόλη εσπεριδίνη
ισοφλαβόνη		γενιστίνη γενιστεΐνη δαιζδίνη δαιζδεΐνη
ανθοκυανιδίνη		απιγενιδίνη κυανιδίνη

2. Φαινολικά οξέα

Μετά τα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη υποκατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων, έχοντας ως βάση το υδροξυκινναμικό ή το υδροξυβενζοϊκό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα (όπως το καφεϊκό, το κουμαρικό και το φερούλικό οξύ) παράγονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υδροξυβενζοϊκά και συνήθως συναντώνται σε γλυκοζυλιωμένη ή εστερική μορφή. Από την άλλη, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. το γαλλικό οξύ) βρίσκονται συνήθως σε μικρές ποσότητες, αποτελώντας κυρίως υπομονάδες πολυμερών (π.χ. ταννίνες) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Χημική δομή των πολυφαινολικών οξέων

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

3. Στιλβένια

Αυτή η υποκατηγορία είναι σαφώς μικρότερη από τις άλλες δυο, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την ρεσβερατρόλη. Πρόκειται για μια ένωση με δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου που βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες στα κόκκινα σταφύλια, είτε σε μονομερή μορφή είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες. Παρόλο που τα στιλβένια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των διαιτητικά προσλαμβανόμενων πολυφαινολών, παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες καθώς σε έρευνες επέδειξαν καρδιοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση (133).

4. Λιγνάνες

Η τέταρτη και τελευταία υποκατηγορία πολυφαινολών χαρακτηρίζεται από τη σύνδεση δυο φαινυλπροπανικών μορίων. Ο λιναρόσπορος αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές λιγνανών, οι οποίες έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελετών για την πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση τους (134).

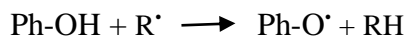
Βιολογικές δράσεις πολυφαινολών

Η επίδραση που έχουν οι πολυφαινόλες έπειτα από κατανάλωση τους μέσω φυτικών προϊόντων είναι πολυπαραγοντική. Από τη μία, οι πολυφαινόλες συναντώνται υπό τη μορφή μίγματος καθώς αναλόγως του είδους του φυτού και των περιβαλλοντικών συνθηκών (παρουσία βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων) η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ποικίλει, καθιστώντας δύσκολη την ανάλυση της δράσης κάθε συστατικού ξεχωριστά. Από την άλλη, ακόμα και αν απομονωθεί μια πολυφαινόλη η μελέτη της βιοδραστικότητας της είναι δύσκολη διότι επηρεάζεται από την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και τον καταμερισμό τόσο του αρχικού μορίου όσο και των μεταβολιτών της στον εκάστοτε οργανισμό (135). Παρότι έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη βιοδραστικότητα των πολυφαινολών, τα αποτελέσματα παραμένουν ασαφή και με μικρή επαναληψιμότητα, ιδίως στα *in vivo* πειράματα (129,136,137).

Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα κυρίως λόγω δομής, καθώς ο υποκατεστημένος με υδροξύλια αρωματικός δακτύλιος μπορεί να προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο ή πρωτόνιο του υδροξυλίου σε ελεύθερες ρίζες, αδρανοποιώντας τις. Αυτή η δυνατότητα έχει βάση στην αποδυνάμωση του δεσμού μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου της υδροξυλικής ομάδας λόγω της χημικής φύσης του αρωματικού δακτυλίου. Έτσι καθίσταται δυνατή η μεταφορά είτε ενός πρωτονίου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) είτε ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) (138). Ωστόσο, οι πολυφαινόλες συχνά παρουσιάζουν και χηλική ικανότητα που εμμέσως τις καθιστά αντιοξειδωτικές λόγω δέσμευσης σιδήρου ή χαλκού που μετέχουν σε αντιδράσεις Fenton (138). Είναι αξιοσημείωτο πως η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων εβρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με τον αριθμό των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων.

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν την ικανότητα προσφοράς ηλεκτρονίων λόγω χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής. Κατ' αυτό τον τρόπο, μόρια με υψηλότερο δυναμικό όπως οι ρίζες ανιόντος του σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου εξουδετερώνονται από τις πολυφαινόλες σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Όπου R^{\bullet} ελεύθερη ρίζα, Ph-OH φαινολικό μόριο και Ph-O $^{\bullet}$ η φαινοξυλική ρίζα.

Η φαινοξυλική ρίζα (ημικινόνη) που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση είναι πιο σταθερή από την αρχική ρίζα, ώντας έτσι ανίκανη να πυροδοτήσει περαιτέρω οξείδωση. Η πλήρης σταθεροποίηση της ημικινόνης λαμβάνει χώρα έπειτα από αλληλεπίδραση με μια δεύτερη ρίζα (πχ μια ακόμα ημικινόνη), οδηγώντας στην πιο σταθερή δομή της κινόνης (138).

Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η ικανότητα να παρουσιάζουν προοξειδωτική δράση. Σε αυτή την ικανότητα καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η συγκέντρωσή τους, η παρουσία στοιχείων μετάπτωσης (Fe^{+2} , Cu^{+}), το pH, ενώ όπως και στην αντιοξειδωτική δράση, σημασία έχει και ο αριθμός των υδροξυλομάδων καθώς και η θέση υποκατάστασης (136,139). Το κατά πόσο μια πολυφαινολική ένωση θα δράσει αντι- ή προ-οξειδωτικά καθορίζεται από το συνδυασμό των άνωθεν παραγόντων.

Όπως φάνηκε και στην αντιοξειδωτική δράση, η εξουδετέρωση μιας ελεύθερης ρίζας περιλαμβάνει το σχηματισμό μιας ημικινόνης. Αυτά τα μόρια έχουν χρόνο ημιζωής 200 μικροδευτερόλεπτα, χρόνος στον οποίον μπορούν να αλληλεπιδράσουν με O_2 οδηγώντας στην παραγωγή $\text{O}_2^{\bullet -}$ και προϋποθέτοντας την ταυτόχρονη παρουσία στοιχείων μετάπτωσης.

Τοιουτοτρόπως, η διαδικασία οξείδωσης των πολυφαινολικών μορίων μπορεί να οδηγήσει στο ελευθέρων ριζών. Αυτή η ικανότητα έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις, καθώς δυνητικά θα μπορούσε να προκαλέσει οξειδωτικό στρες σε ένα κύτταρο, βρίσκοντας εφαρμογή στα αντικαρκινικά φάρμακα, ως συμπληρωματική θεραπεία για ευαισθητοποίηση του καρκινικού όγκου (139,140). Αυτό στηρίζεται και από την παρατήρηση πως έπειτα από χορήγηση πολυφαινολών σε *in vitro* κυτταρικές σειρές επήλθε κυτταρικός θάνατος.

1.6. Βιοδραστικές ενώσεις φυτικών προϊόντων

Τελευταία, πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τη χημειοπροστατευτική δράση παραγόντων που προέρχονται από την κατανάλωση τροφίμων στην καθημερινή διατροφή. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, οι οποίες είναι ουσίες φυτικής προελεύσεως των τροφίμων και οι ιδιότητές τους συμβάλλουν στην προστασία χρόνιων παθήσεων (141,142). Αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών σχετίζουν τις ευεργετικές επιδράσεις της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών σε χρόνιες παθήσεις με τις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν, με κυριότερες τις πολυφαινόλες, οι οποίες είναι και αυτές που έχουν εκτενώς μελετηθεί για τις βιολογικές τους ιδιότητες (141–143)

1.6.1. Οι πολυφαινόλες των στεμφύλων

Τα στέμφυλα χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, βιοδραστικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, οι οποίες παραμένουν στα γίγαρτα, στο φλοιό, στους μίσχους και στα υπολείμματα της σάρκας των σταφυλιών, κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (34,37–40). Τέτοιες ενώσεις είναι κυρίως οι ανθοκυανίνες που βρίσκονται στη φλούδα, οι φλαβονόλες, τα στυλβένια, με πιο σημαντική για τις ευεργετικές της δράσεις, τη ρεσβερατρόλη, και φαινολικά οξέα. Γενικά το πλήθος των πολυφαινολών των σταφυλιών βρίσκεται κυρίως στους φλοιούς, στους βόστρυχους και τα γίγαρτα, και όχι στο εσωτερικό του καρπού τους (Πίνακας 3) (3).

Οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στα στέμφυλα έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την τοξικότητα που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν την οξειδωτική βλάβη βιολογικών μακρομορίων. Επιπλέον, συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα των ζωικών οργανισμών αυξάνοντας τα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και η καταλάση (CAT), ενισχύοντας έτσι το ανοσοποιητικό τους σύστημα (34).

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

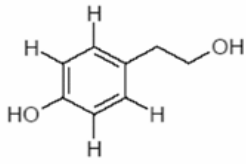
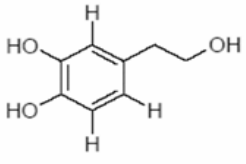
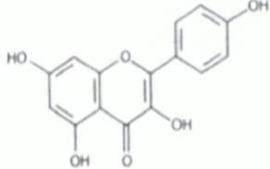
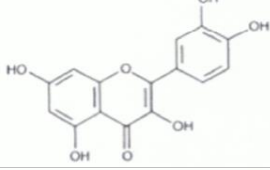
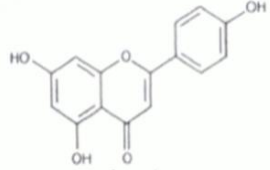
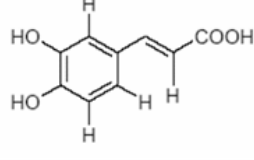
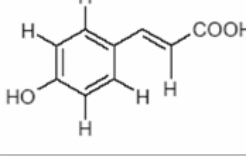
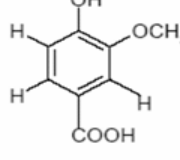
Ένωση	Στέμφυλα	Φλοιός	Σπόρια	Μίσχος
Γαλλικό οξύ	0,03-0,11	0,03	0,10-0,11	-
Κουμαρικό οξύ	0-1,23	0,03-1,23	-	-
Καφταρικό οξύ	0-6,97	0,11-6,97	-	0,04
Κατεχίνη	0-0,18	0-0,16	2,14-2,15	0,06
Επικατεχίνη	0-0,16	0-0,13	0,88-0,91	0,28
Επικατεχίνη-3-γαλλική	0-0,03	0,04	0,25-0,31	0,07
Ταννίνες	0,22-2,32	1,61	3,56-6,15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

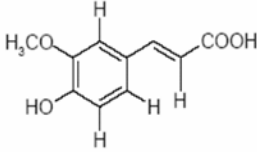
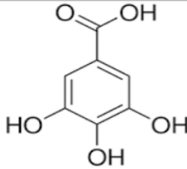
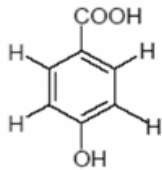
1.6.2. Οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ

Η ελευρωπεΐνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα ΥΑΕ. Οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ αποτελούν το 53% περίπου των συνολικών πολυφαινολών των υποπροϊόντων των ελαιοτριβείων. Ένα λίτρο υγρών αποβλήτων περιέχει 130 mg υδροξυτυροσόλης, που αποτελεί μια εξαιρετική και ανεκμετάλλευτη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών.

Άλλες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στο ελαιόλαδο και στα ΥΑΕ είναι το καφεϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το υδροξυβενζοϊκό οξύ, η καμφερόλη, η απιγενίνη και η κερκετίνη (46,144,145) (Πίνακας 4). Παρά τις τοξικές επιδράσεις που εμφανίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, αυτές οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν επίσης αντιοξειδωτική δράση. Ως εκ τούτου, το πολυφαινολικό περιεχόμενο των ΥΑΕ θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή αντιοξειδωτικών σε διάφορους τομείς, όπως οι βιομηχανίες διατροφής, φαρμάκων και καλλυντικών, μειώνοντας ταυτόχρονα την περιβαλλοντική ρύπανση που προκαλούν τα ΥΑΕ (46,146).

Πίνακας 4. Πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου

Πολυφαινόλες	Χημικός τύπος
Τυροσόλη	
Υδροξυτυροσόλη	
Καμφερόλη	
Κερκετίνη	
Απιγενίνη	
Καφεϊκό οξύ	
Κουμαρικό οξύ	
Βανιλικό οξύ	

Φερουλικό οξύ	
Γαλλικό οξύ	
Υδροξυβενζοϊκό οξύ	

1.7. Σκοπός της διατριβής

Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από το γεγονός ότι η διατροφή αποτελεί βασικό παράγοντα της ζωικής παραγωγής, δεδομένου ότι δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των παραγωγικών ζώων αλλά και το κόστος των ζωικών προϊόντων. Τα εκτρεφόμενα παραγωγικά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες εξαιτίας της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας και της έλλειψης προσαρμογής τους σε διάφορες διατροφικές αλλαγές. Η ευζωία τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον εκτροφής και τις συνθήκες ενσταβλισμού τους. Επιπλέον, η εντατική εκτροφή των παραγωγικών ζώων προκαλεί στρεσογόνα φαινόμενα, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, με συνέπεια την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι οι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στα τρόφιμα προκειμένου να αναπτυχθούν βιολειτουργικά προϊόντα, βελτιστοποιούν την αποδοτικότητα, την παραγωγικότητα και την καλή διαβίωση των ζώων προστατεύοντάς τα από τέτοιες ασθένειες (143,147–149). Η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών με αντιοξειδωτική δράση και αποδεδειγμένες θεραπευτικές ιδιότητες μπορεί να βελτιώσει την ευζωία και την παραγωγικότητά τους. Αυτό μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και οικονομικά αποδοτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες και επιπλέον να προστατεύσει τα νεαρά ζώα από αυτές τις ασθένειες, αφού εκείνα έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σχέση με τα ενήλικα.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών εμπλουτισμένων με υποπροϊόντα οινοποίησης και ελαιολιτριβείου σε κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιολόγηση δεικτών που σχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό προφίλ του αίματος και των ιστών ζωικών τους οργάνων (αντιοξειδωτικά μόρια και ένζυμα, βλάβες σε λιπίδια και πρωτεΐνες). Έτσι η αξιοποίηση των υποπροϊόντων αγροτικών βιομηχανιών που παράγονται κατά την επεξεργασία των σταφυλιών και της ελιάς (στέμφυλα και ΥΑΕ), μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών για τα παραγωγικά ζώα, προκειμένου να ενισχυθεί η αντιοξειδωτική τους άμυνα, οδηγώντας στη βελτίωση της ευζωίας και της παραγωγικότητάς τους. Επιπλέον, εξ' αιτίας του γεγονότος ότι τα στέμφυλα και τα ΥΑΕ αποτελούν έναν σοβαρό περιβαλλοντικό ρύπο, λόγω του υψηλού οργανικού τους φορτίου, η αξιοποίησή τους μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της ρύπανσης που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Παρασκευή και μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών με *in vitro* τεχνικές.

Το πρώτο στάδιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε αρχικά την παρασκευή και στη συνέχεια τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών, οι οποίες ήταν εμπλουτισμένες με τα υποπροϊόντα γεωργικών βιομηχανιών (στέμφυλα και ΥΑΕ), προκειμένου να γίνει η σύγκρισή τους με την κοινή ζωοτροφή. Για να γίνει αυτό, αρχικά, αναμίχθηκαν όλα τα απαραίτητα συστατικά που απαιτούνται για την παρασκευή των ζωοτροφών. Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν εκχυλίσματα από τις ζωοτροφές, προκειμένου να εξετασθεί η αντιοξειδωτική ικανότητά τους μέσω σειράς δοκιμασιών, ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη εκτίμηση της δραστηριότητας των διαφορετικών συστατικών των ζωοτροφών.

Σκοπός αυτού του μέρους της διατριβής ήταν η μελέτη και η σύγκριση των εμπλουτισμένων ζωοτροφών σε σχέση με τις ζωοτροφές του εμπορίου, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση των υποπροϊόντων στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών, με στόχο την περαιτέρω χρήση τους σε επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

2.1. Παρασκευή βιολειτουργικών ζωοτροφών

2.1.1. Εισαγωγή

Ο όρος ζωοτροφή αναφέρεται σε κάθε συστατικό φυτικής, ζωικής και ανόργανης προέλευσης, η οποία χορηγείται για κατανάλωση από τα ζώα είτε με τα αρχικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της, είτε ύστερα από βιομηχανική επεξεργασία, συμβάλλοντας στη σωστή θρέψη και ανάπτυξη των ζώων χωρίς να επιβαρύνει την υγεία τους. Είναι γνωστό ότι τα παραγωγικά ζώα σε νεαρή ηλικία είναι επιρρεπή σε ποικίλες ασθένειες όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως (96). Επομένως η χορήγηση ζωοτροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά είναι πιθανόν να είναι ευεργετική στην υγεία των ζώων, προστατεύοντάς τα από ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (34,46,95,97).

Σαν πρόσθετα συστατικά των ζωοτροφών ορίζονται οι διάφορες ουσίες που προστίθενται σε αυτές, ώστε να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά τους και κατά συνέπεια να ενισχύσουν την παραγωγικότητα και την ευζωία των ζώων μέσω της κατανάλωσής τους.

2.1.2. Ενσίρωση

Προκειμένου λοιπόν να παρασκευαστούν ζωοτροφές εμπλουτισμένες τόσο με υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα), όσο και με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), ακολουθήθηκε μια διαδικασία που ονομάζεται **ενσίρωση**. Τα υποπροϊόντα δηλαδή που χρησιμοποιήθηκαν, δεν αναμείχθηκαν απευθείας με τα υπόλοιπα συστατικά των δύο ζωοτροφών, αλλά ενσωματώθηκαν σε αυτές με τη μορφή ενσιρώματος. Η διαδικασία της ενσίρωσης αποτελεί μια διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας, που πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες με την προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacillus sp.*). Το χαρακτηριστικό αυτών των βακτηρίων είναι ότι επιβιώνουν σε αυτές τις συνθήκες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των ενσιρωμάτων. Η διαδικασία της ενσίρωσης ακολουθήθηκε με σκοπό να διατηρηθεί το προϊόν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να βελτιωθεί η θρεπτική του αξία ώστε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σαν ζωοτροφή, αφού κατά τη διάρκειά της, δημιουργούνται όξινες συνθήκες που συμβάλλουν στη διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης των ζωοτροφών.

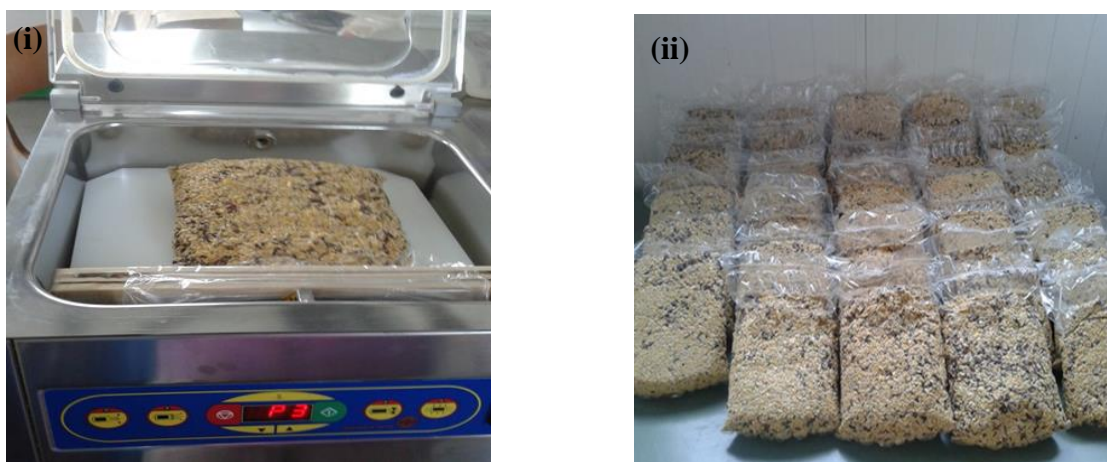
Για τη διαδικασία της ενσίρωσης, τα φυτά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι υψηλά σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία υψηλής πεπτικότητας και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πιο κατάλληλα φυτά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το καλαμπόκι και η μηδική (τριφύλλι). Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε καλαμπόκι το οποίο αναμείχθηκε με κατάλληλη ποσότητα νερού, για την διατήρηση της υγρασίας, και ποσότητα από τα δύο υποπροϊόντα (στέμφυλα και ΥΑΕ) ώστε να παραχθεί το τελικό ενσίρωμα που, εν συνεχεία, θα αναμειχθεί με τα υπόλοιπα απαραίτητα συστατικά για την ολοκληρωμένη ζωοτροφή.

2.1.3. Διαδικασία παρασκευής ενσιρωμάτων

Πριν την παρασκευή της τελικής ζωοτροφής, είναι απαραίτητο προηγουμένως να παρασκευαστεί ενσίρωμα καλαμποκιού. Με βάση προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια ώστε το τελικό ενσίρωμα να περιέχει 60% στερεά και 40% υγρασία (146,150). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η αναλογία στα τελικά ενσιρώματα, πριν την ανάμιξη υπολογίστηκαν τα ποσοστά υγρασίας τόσο του καλαμποκιού, όσο και των δυο υποπροϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τους. Το ενσίρωμα περιείχε κάθε φορά ποσότητα καλαμποκιού, νερό, τα δυο υποπροϊόντα και γαλακτικά βακτήρια. Για την γαλακτική ζύμωση του καλαμποκιού και την παρασκευή ενσιρώματος καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκε τυποποιημένη εμπορική σύνθεση (11CFT, Pioneer, Buxtehude, Germany) γαλακτικών βακτηρίων. Τα γαλακτικά βακτήρια διαλύθηκαν σε νερό (10% w/v) με ανάδευση, και θερμάνθηκαν στους 40 °C ώστε να ενεργοποιηθούν πριν από την ανάμιξη με το καλαμπόκι. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα γαλακτικά βακτήρια αναμείχθηκαν με το καλαμπόκι, στην ακόλουθη αναλογία: για κάθε 100 kg καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκε 1 g βακτήρια (34,46).

Για την παραγωγή του ενσιρώματος, το μείγμα γαλακτικών βακτηρίων και καλαμποκιού τοποθετήθηκε σε ειδικές πλαστικές σακούλες οι οποίες σφραγίστηκαν αεροστεγώς με θερμοσυγκόλληση, με τη χρήση ειδικού μηχανήματος που δημιουργεί κενό και αφαιρεί τον αέρα, αφού τα γαλακτικά βακτήρια απαιτούν αναερόβιες συνθήκες ώστε να πραγματοποιηθεί η ζύμωση (Εικόνα 12). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο οδηγεί σε διόγκωση των σακουλιών. Προκειμένου λοιπόν

να αποφευχθεί η διάτρησή τους, το περιεχόμενο υλικό επανασυσκευάστηκε σε καινούργιες πλαστικές σακούλες, οι οποίες κλείνονταν ξανά αεροστεγώς, κάθε 2 με 3 ημέρες (ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος). Η παραπάνω διαδικασία που πραγματοποιήθηκε 4 φορές ήταν αναγκαία, αφού αν δεν αφαιρούνταν ο αέρας από τις σακούλες, υπήρχε κίνδυνος να ανοίξουν και το περιεχόμενο να έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, γεγονός που θα ανέστειλε την αντίδραση, αναερόβιες συνθήκες. Το τελικό ενσίρωμα αναμείχθηκε, λίγο πριν τη χορήγηση, και με τα υπόλοιπα συστατικά των ζωοτροφών ώστε να σχηματιστεί η πλήρης ζωοτροφή τόσο για τα νεαρά κοτόπουλα, όσο και για τα πρόβατα κρεοπαραγωγής (34,46).



Εικόνα 12. (i) Διαδικασία συσκευασίας με μηχάνημα αποσυμπίεσης και (ii) τρόπος αποθήκευσης ενσιρωμάτων

Αξίζει να σημειωθεί ότι κριτήριο για ένα καλό ενσίρωμα αποτελεί το όξινο pH του. Έτσι, συνήθως η κατάλληλη τιμή του pH πρέπει να είναι μικρότερη από 4,1. Για το λόγο αυτό, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, λήφθηκαν δείγματα της ενσιρωμένης ζωοτροφής με σκοπό τη μέτρηση και τη ρύθμιση του pH. Ο προσδιορισμός του έγινε με 2 τρόπους: (α) πραγματοποιήθηκε αραιώση του ενσιρώματος, δηλαδή σε 1 g ενσιρώματος προστέθηκαν 9 ml dH₂O και το μίγμα αναδεύθηκε έντονα με vortex για 20 λεπτά και (β) πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/2 του ενσιρώματος, δηλαδή 5 g ενσιρώματος προστέθηκαν σε 5 ml dH₂O και ακολουθήθηκε ξανά η παραπάνω διαδικασία (ανάδευση για 20 λεπτά). Όταν η τιμή του pH στο ενσίρωμα, έφτασε τελικά να είναι μικρότερη από 4,1, η διαδικασία της ενσίρωσης ολοκληρώθηκε αφού δεν παράγονταν επιπλέον διοξείδιο του άνθρακα (η ζύμωση των γαλακτικών βακτηρίων είχε τελειώσει). Όλη η διαδικασία της ενσίρωσης

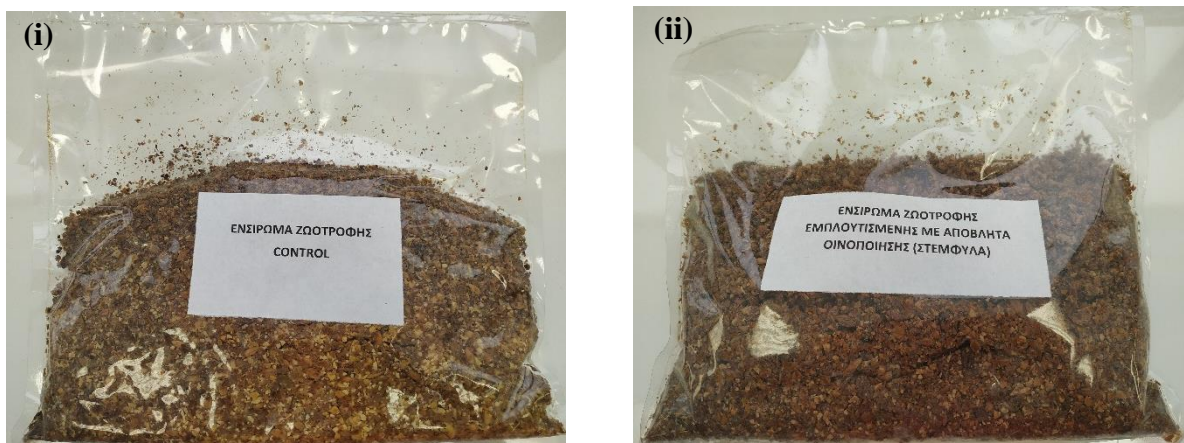
πραγματοποιήθηκε πριν την παρασκευή των τελικών ζωοτροφών και διήρκησε περίπου 3-4 εβδομάδες.

2.1.3.1. Σιτηρέσιο με υποπροϊόντα οινοποίησης - Στέμφυλα

Η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα χορηγήθηκε σε νεαρά κοτόπουλα κρεοπαραγωγής. Προκειμένου λοιπόν να διερευνηθεί η πιθανή αντιοξειδωτική δράση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με τα στέμφυλα (βλ. εισαγωγή) σε σχέση με την κοινή ζωοτροφή του εμπορίου, έπρεπε να παρασκευαστούν δύο ενσιρώματα (Εικόνα 13 (i), (ii)) και τελικά δύο ζωοτροφές με διαφορετική σύσταση για τις δύο ομάδες πειραματισμού:

(α) σιτηρέσιο για την ομάδα ελέγχου: περιελάμβανε ενσίρωμα καλαμποκιού και νερό σε αναλογία 60% στερεά και 40% υγρασία αντίστοιχα

(β) σιτηρέσιο για την ομάδα των στεμφύλων: περιελάμβανε ενσίρωμα με καλαμπόκι, στέμφυλα και νερό, σε αναλογία 60% στερεά και 40% υγρασία αντίστοιχα.



Εικόνα 13. Ενσιρώματα καλαμποκιού για τις ζωοτροφές των νεαρών κοτόπουλων (i) ομάδας ελέγχου και (ii) ομάδας στεμφύλων

Στα δύο τελικά σιτηρέσια προστέθηκαν συστατικά που περιείχαν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ύλες που απαιτούνται για τις ενεργειακές και διατροφικές ανάγκες των νεαρών κοτόπουλων. Έτσι, και τα δυο σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες της υγείας των αναπτυσσόμενων κοτόπουλων. Η σύσταση των δυο τελικών ζωοτροφών φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 5. Σύσταση πειραματικού σιτηρέσιου για τη διατροφή των κοτόπουλων

	Σύσταση (% w/w)	
	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα Στεμφύλων
Ενσίρωμα καλαμποκιού	55,2 ¹	55,2 ²
Σογιάλευρο 42/8	31,8	31,8
Λεκιθίνη (λίπος σε σκόνη)	5,0	5,0
Ιχθυάλευρο 70/10	4,0	4,0
Ισορροπιστής Broiler 2.5%	2,5	2,5
Μαρμαρόσκηνη	1,5	1,5
Σύνολο	100	100

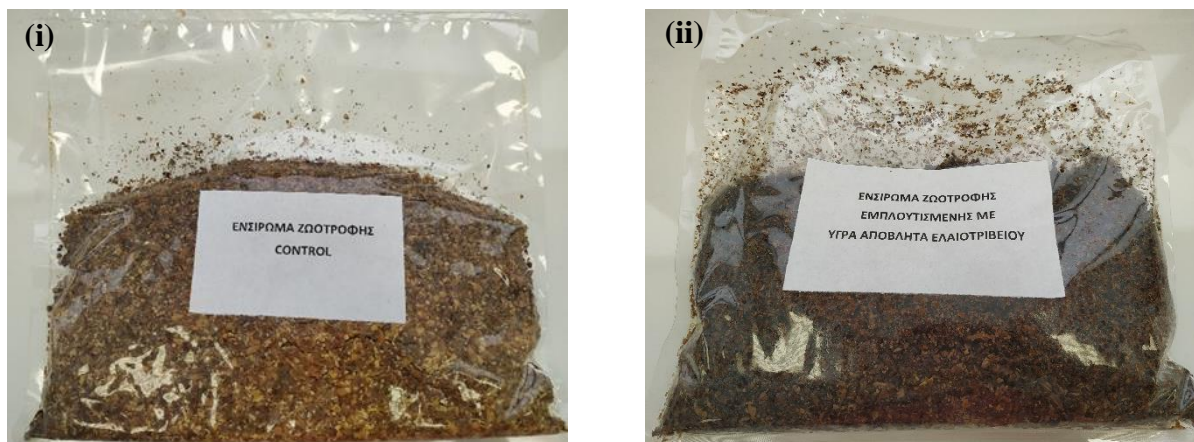
¹ Το ενσίρωμα της ομάδας ελέγχου περιείχε 60% στερεά (καλαμπόκι) και 40% υγρασία (νερό)

² Το ενσίρωμα της ομάδας στεμφύλων περιείχε 51% στερεά (καλαμπόκι), 9% στερεά στέμφυλα και 40% υγρασία

2.1.3.2. Σιτηρέσιο με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

Η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς (υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου) χορηγήθηκε σε νεαρά πρόβατα κρεοπαραγωγής τόσο στο στάδιο πριν, όσο και στο στάδιο μετά τον απογαλακτισμό. Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής παρασκευάστηκαν, όπως και προηγουμένως, βασιζόμενοι επίσης σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (146,150,151), δυο διαφορετικά ενσιρώματα (Εικόνα 14 (i), (ii)) και άρα δυο διαφορετικές τελικές ζωοτροφές προκειμένου να γίνει η σύγκριση μεταξύ τους:

- (α) σιτηρέσιο για την ομάδα ελέγχου: περιελάμβανε ενσίρωμα καλαμποκιού και νερό σε αναλογία 60% στερεά και 40% υγρασία αντίστοιχα
- (β) σιτηρέσιο για την ομάδα των ΥΑΕ: περιελάμβανε ενσίρωμα με καλαμπόκι, ΥΑΕ και νερό, σε αναλογία 60% στερεά και 40% υγρασία αντίστοιχα.



Εικόνα 14. Ενσίρωματα καλαμποκιού για τις ζωοτροφές των νεαρών προβάτων (i) ομάδας ελέγχου και (ii) ομάδας ΥΑΕ

Εξ' αιτίας του γεγονότος ότι τα συστατικά των ζωοτροφών των νεαρών προβάτων διαφέρουν κατά την περίοδο του μερικού και πλήρους απογαλακτισμού, οι ποσότητες προσαρμόστηκαν έτσι ώστε οι ζωοτροφές που παρασκευάστηκαν να καλύπτουν εξ' ολοκλήρου τις διατροφικές ανάγκες των ζώων σε κάθε στάδιο. Όπως αναφέρθηκε και για τη ζωοτροφή των κοτόπουλων, τα σιτηρέσια που παρασκευάστηκαν για τα πρόβατα ήταν και αυτά ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες της υγείας τους. Η σύσταση των δυο τελικών ζωοτροφών φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 6, Πίνακας 7), πριν και μετά τον απογαλακτισμό:

Πίνακας 6. Σύσταση πειραματικού σιτηρέσιου για τη διατροφή των προβάτων – Πριν τον απογαλακτισμό

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Σύσταση (% w/w)	
	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα ΥΑΕ
Ενσίρωμα καλαμποκιού	45 ¹	45 ²
Πίτυρα σίτου	9	9
Σογιάλευρο	21	21
Γάλα	20	20
Ισορροπιστής	2,5	2,5
Άλας	0,5	0,5
Μαρμαρόσκονη	1,2	1,2
Φωσφορικό μονοασβέστιο	0,8	0,8
Σύνολο	100	100

¹ Το ενσίρωμα της ομάδας ελέγχου περιείχε 60% στερεά (καλαμπόκι) και 40% υγρασία (νερό)

² Το ενσίρωμα της ομάδας ΥΑΕ περιείχε 52,5 % στερεά (καλαμπόκι), 7,5 % ΥΑΕ και 40% υγρασία

Πίνακας 7. Σύσταση πειραματικού σιτηρεσίου για τη διατροφή των προβάτων – Μετά τον απογαλακτισμό

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Σύσταση (% w/w)	
	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα ΥΑΕ
Ενσίρωμα καλαμποκιού	45 ¹	45 ²
Καρπός σίτου	13	13
Πίτυρα σίτου	15	15
Σογιάλευρο	18	18
Ηλιάλευρο	4	4
Ισορροπιστής	2,5	2,5
Αλας	0,5	0,5
Μαρμαρόσκονη	1,2	1,2
Φωσφορικό μονοασβέστιο	0,8	0,8
Σύνολο	100	100

¹ Το ενσίρωμα της ομάδας ελέγχου περιείχε 60% στερεά (καλαμπόκι) και 40% υγρασία (νερό)

² Το ενσίρωμα της ομάδας ΥΑΕ περιείχε 52,5 % στερεά (καλαμπόκι), 7,5 % ΥΑΕ και 40% υγρασία

Όπως παρατηρείται από τους δυο παραπάνω πίνακες, οι τελικές ζωοτροφές έπρεπε να τροποποιηθούν έτσι ώστε να ανταποκρίνονται στις ανάγκες των προβάτων πριν και μετά το απογαλακτισμό τους. Έτσι λοιπόν, το γάλα (Πίνακας 6) αντικαταστάθηκε από τις αντίστοιχες ποσότητες καρπού σίτου και ηλιάλευρου (Πίνακας 7).

2.2. *In vitro* αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των βιολειτουργικών ζωοτροφών

2.2.1. Παρασκευή εκχυλισμάτων ζωοτροφών

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* των πειραματικών ζωοτροφών ήταν απαραίτητο προηγουμένως να παρασκευαστούν τα αντίστοιχα εκχυλίσματα:

1. (α) εκχύλισμα ζωοτροφής ομάδας ελέγχου και (β) ομάδας στεμφύλων για τα νεαρά κοτόπουλα κρεοπαραγωγής
2. (α) εκχύλισμα ζωοτροφής ομάδας ελέγχου και (β) ομάδας ΥΑΕ για τα νεαρά πρόβατα κρεοπαραγωγής

Έτσι, παρασκευάστηκαν διαλύματα των παραπάνω ζωοτροφών συγκέντρωσης 10% w/v (1 g/ζωοτροφή σε 10 ml dH₂O) διαλύθηκαν με ανάδευση vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν στις μεθόδους.

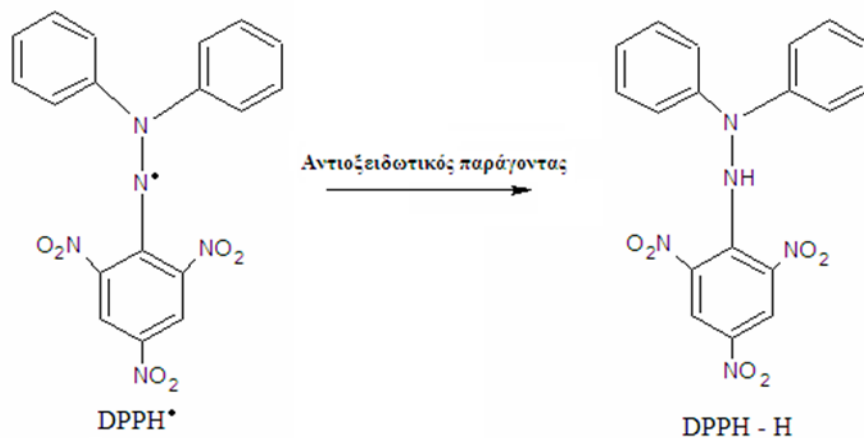


Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις δυο παρακάτω μεθόδους:

2.2.2. Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•

Ο προσδιορισμός της ρίζας DPPH• αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Brand – Williams και συνεργάτες και αναφέρεται από τους Apostolou και συνεργάτες (152,153). Η μέθοδος για την αντιοξειδωτική ικανότητα βασίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζιλίου (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH•). Αποτελεί, σε αρχικό στάδιο, μια από τις πιο απλές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να χαρακτηριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος ή μιας ουσίας. Τα προς εξέταση μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να εξουδετερώσουν την τεχνητή ρίζα DPPH•, είτε μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, είτε μέσω ενός ατόμου υδρογόνου. Το DPPH• είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, που έχει έντονο μωβ χρώμα με

μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm. Όταν μέσα στην εξεταζόμενη ουσία υπάρχει ένα αντιοξειδωτικό, τότε η εξουδετέρωσή της από αυτό θα οδηγήσει στην παραγωγή της αντίστοιχης υδραζίνης η οποία έχει κίτρινο χρώμα και απορροφά στα 517nm, με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης (Εικόνα 15). Όσο πιο κίτρινη γίνει η εξεταζόμενη ουσία με την προσθήκη της ρίζας DPPH[•], τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει.



Εικόνα 15. Μετατροπή της ρίζας DPPH[•] στην αντίστοιχη υδραζίνη παρουσία ενός αντιοξειδωτικού

Συγκεκριμένα, σε σωληνάκια erpendorf 1,5 ml προστίθενται 900 μl μεθανόλης, 50 μl εκχυλίσματος από τις ζωοτροφές (ελέγχου, στεμφύλων και ΥΑΕ) σε διάφορες συγκεντρώσεις (50, 100, 250, 500, 1000 μg/ml) και 50 μl DPPH[•] (0,1 mM) όπως περιγράφεται στον πίνακα 8 (Πίνακας 8). Στη συνέχεια, τα σωληνάκια ανακινήθηκαν με vortex, επώστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου - RT για 20 λεπτά και φωτομετρήθηκαν στα 517 nm. Για κάθε δείγμα υπήρχε το αντίστοιχο τυφλό του, όπου στα σωληνάκια προστέθηκαν μόνο 50 μl από τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των ζωοτροφών και 950 μl μεθανόλης (απουσία της ρίζας DPPH[•]) (Πίνακας 9) καθώς και ο μάρτυρας που περιείχε μόνο 950 μl μεθανόλης και 50 μl DPPH[•]. Πριν τη φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε μηδενισμός του φωτομέτρου με σωληνάκι με 1 ml μεθανόλης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 1000 μl και κάθε δείγμα μετρήθηκε σε τριπλέτα.

Πίνακας 8. Διαδοχική σειρά και ποσότητες προσθήκης αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Μεθανόλη	1000 µl	950 µl	900 µl	900 µl	900 µl	900 µl	900 µl
DPPH [•]	-	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

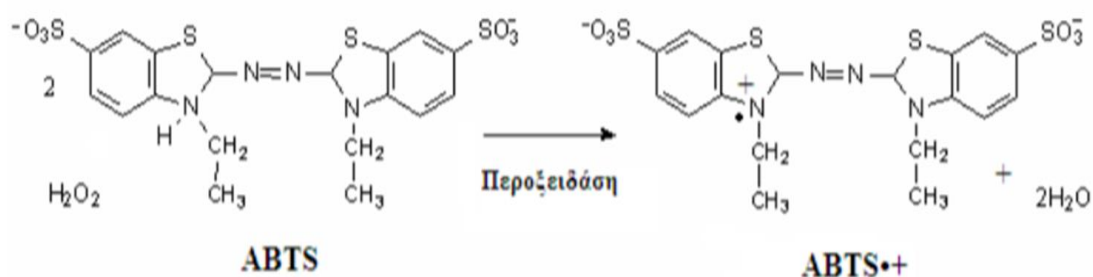
Πίνακας 9. Έλεγχος απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας, σε μεθανόλη

	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Μεθανόλη	950 µl	950 µl	950 µl	950 µl	950 µl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

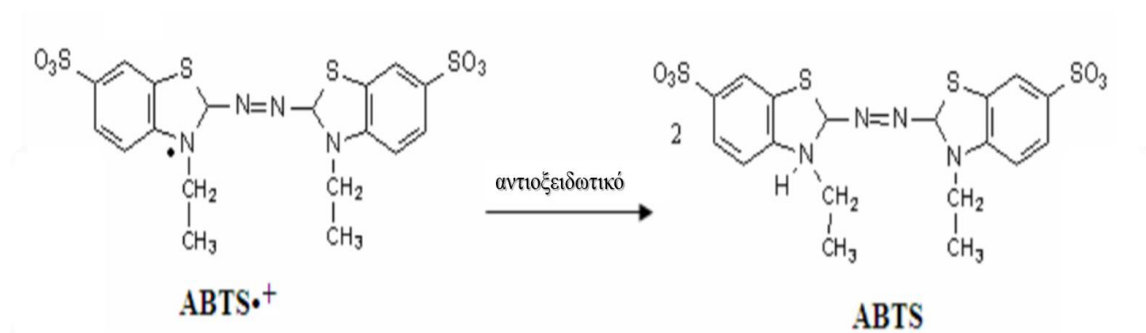
2.2.3. Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS[•]

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων μέσω της εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS[•] αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Cano και συνεργάτες (154) και βασίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας [2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid), ABTS]. Η μέθοδος εξουδετέρωσης είναι παρόμοια με τη ρίζα DPPH[•] αφού και το ABTS^{•+} μπορεί να εξουδετερωθεί είτε μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, είτε ενός ατόμου υδρογόνου. Παρόλα αυτά το ABTS^{•+} σε αντίθεση με το DPPH[•] δεν αποτελεί μια σταθερή ρίζα, και πρέπει πρώτα να παραχθεί και στη συνέχεια να προστεθεί το εξεταζόμενο εκχύλισμα με την πιθανή αντιοξειδωτική δράση (Εικόνα 16). Ο σχηματισμός της ρίζας ABTS^{•+} δίνει στο διάλυμα ένα πράσινο χρώμα το οποίο απορροφά στα 730 nm. Μόλις προστεθεί σε αυτό μια αντιοξειδωτική ουσία, η οποία θα οδηγήσει σε εξουδετέρωση της ρίζας (Εικόνα 17), το διάλυμα θα αποχρωματιστεί και άρα η απορρόφησή του θα μειωθεί. Έτσι, όσο περισσότερος αποχρωματισμός παρατηρείται σε ένα διάλυμα, τόσο

μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το μελετηθέν εκχύλισμα που έχει προστεθεί σε αυτό.



Εικόνα 16. Παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω HRP παρουσία H₂O₂



Εικόνα 17. Αναγωγή της ρίζας ABTS^{•+} παρουσία αντιοξειδωτικού

Η ρίζα ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του ABTS μέσω δράσης της υπεροξειδάσης του χρένου (Horseradish peroxidase, HRP), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Αρχικά, παρασκευάζονται διαφορετικές αραιώσεις των εκχυλισμάτων των ζωοτροφών (5, 10, 25, 50, 100 μg/ml). Στη συνέχεια, αφού όπως περιγράφηκε, πρέπει πρώτα να παραχθεί η ρίζα ABTS^{•+}, σε σωληνάκια erpendorf 1,5 ml προστίθενται κατά σειρά: 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ και 6 μM HRP, όπως φαίνεται στον πίνακα 10 (Πίνακας 10). Τα δείγματα αναδεύονται με vortex και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι, σε RT για 45 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των προς μελέτη ζωοτροφών, τα σωληνάκια ανακινούνται ξανά και μετράται η οπτική απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 730 nm. Όπως και στη μέθοδο του DPPH[•], κάθε δείγμα έχει το αντίστοιχο τυφλό του, όπου στα σωληνάκια προστίθενται όλα τα

αντιδραστήρια πλην του HRP καθώς και ο μάρτυρας που δεν περιέχει ποσότητα εκχυλίσματος (Πίνακας 11). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν και εδώ 1000 μl και κάθε δείγμα μετρήθηκε σε τριπλέτες.

Πίνακας 10. Διαδοχική σειρά και ποσότητες προσθήκης αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
dH₂O	450 μl	400 μl	400 μl	400 μl	400 μl	400μl	400μl
ABTS	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500μl	500μl
H₂O₂	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50μl	50μl
HRP	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50μl	50μl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Επώαση 45 min							

Πίνακας 11. Έλεγχος απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας, απουσία HRP

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
dH₂O	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl
ABTS	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl
H₂O₂	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Εκχύλισμα	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Επώαση 45 min						

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – *In vivo* χορήγηση και μελέτη της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών, με χρήση βιοδεικτών, σε αίμα και ιστούς από κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής.

Το δεύτερο τμήμα της διδακτορικής διατριβής αφορά την *in vivo* χορήγηση των ζωοτροφών που παρασκευάστηκαν και ήταν εμπλουτισμένες με τα υποπροϊόντα οινοποίησης (grape pomace – στέμφυλα) και κατά την παραγωγή ελαιολάδου (Υγρά Απόβλητα ελαιολιτριβείου – ΥΑΕ). Η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με ενσίρωμα στεμφύλων χορηγήθηκε σε νεαρά κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, ενώ εκείνη που ήταν εμπλουτισμένη με ενσίρωμα ΥΑΕ χορηγήθηκε σε νεαρά πρόβατα κρεοπαραγωγής.

Σε πρώτο επίπεδο, ο σκοπός ήταν να μελετηθεί η επίδραση των βιολειτουργικών ζωοτροφών, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ζώων. Έτσι, μετά τη χορήγηση των ζωοτροφών, λήφθηκαν δείγματα αίματος και ιστών από ζωικά τους όργανα (π.χ. καρδιά, ήπαρ, τετρακέφαλος μυς, εγκέφαλος κ.α.) ώστε να διερευνηθεί η δραστηριότητα των ζωοτροφών σε *in vivo* πια επίπεδο. Η μελέτη πληθώρας βιοδεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα των ζωικών οργανισμών είναι πιθανό να προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την αντιοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων ζωοτροφών στην υγεία παραγωγικών ζώων. Έτσι, σε πρώτη φάση μετρήθηκαν δείκτες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα αίματος και ιστών, όπως και με την αποτίμηση οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες.

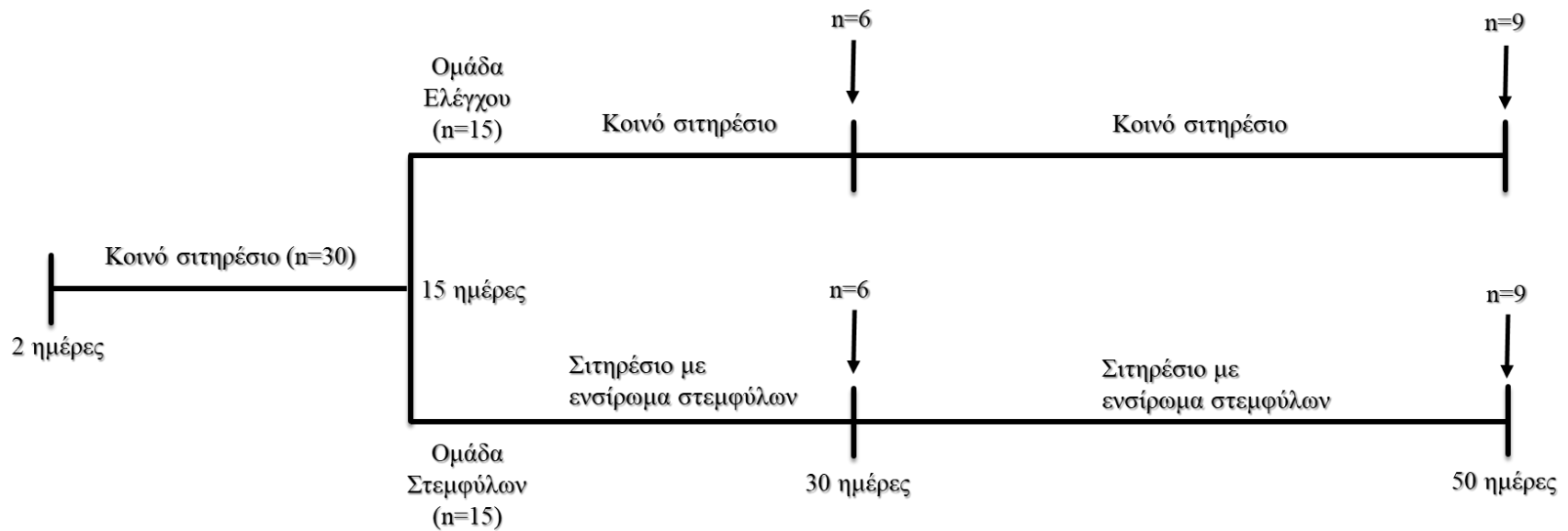
3.1. Πειραματικός σχεδιασμός χορήγησης βιολειτουργικών ζωοτροφών

3.1.1. Πειραματικό πλάνο χορήγησης βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης σε νεαρά κοτόπουλα κρεοπαραγωγής

Για τη διεκπεραίωση του πειράματος, 30 θηλυκά κοτόπουλα της φυλής ‘Hubbard’, ηλικίας 2 ημερών, αγοράστηκαν από τις πτηνοτροφικές εγκαταστάσεις του κ. Αγραφιώτη στον Τύρναβο Λάρισας και μεταφέρθηκαν σε ειδικές εγκαταστάσεις του ΤΕΙ Θεσσαλίας. Τα κοτόπουλα στεγάστηκαν υπό ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12ωρος κύκλος εναλλαγής φωτός/σκότους, θερμοκρασία 18 – 21 °C, υγρασία 50 – 70%) σε τυποποιημένους απλούς κλωβούς (1500 cm²/κλωβί). Από την ημέρα έναρξης του πειράματος (ηλικία κοτόπουλων: 2 ημερών) μέχρι και τη 15^η ημέρα, τα κοτόπουλα είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε κοινή ζωοτροφή και νερό. Την 16^η ημέρα, τα κοτόπουλα χωρίστηκαν τυχαία σε δυο ισάριθμες ομάδες (14 ζώα/ομάδα) όπου η μία ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, ενώ η άλλη, την ομάδα που λάμβανε τη ζωοτροφή με το ενσίρωμα στεμφύλων (ομάδα στεμφύλων). Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε δυο χρονικές στιγμές. Η πρώτη χρονική στιγμή ήταν 30 μέρες μετά τη γέννησή τους (δηλ. 15 μέρες λήψη βιολειτουργικών ζωοτροφών), όπου 6 ζώα από κάθε ομάδα (ελέγχου και στεμφύλων) θυσιάστηκαν για τη λήψη αίματος και ιστών ώστε να γίνουν οι απαραίτητες μετρήσεις. Τα υπόλοιπα κοτόπουλα (9 ζώα/ομάδα) συνέχισαν τη λήψη των δυο πειραματικών ζωοτροφών μέχρι την 50^η ημέρα μετά τη γέννησή τους (δηλ. μετά από 35 ημέρες λήψης τροφής), όπου και τελικά θυσιάστηκαν για τη δεύτερη χρονική στιγμή αιμοληψίας και ιστοληψίας. Καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος, τα κοτόπουλα ζυγίζονταν καθημερινά ώστε να υπολογιστεί η μεταβολή στο βάρος τους, όπως επίσης ζυγίζονταν και οι ταΐστρες της κάθε ομάδας ώστε να υπολογιστεί η κατανάλωση της τροφής. Μια ημέρα πριν την κάθε δειγματοληψία τα ζώα και των δυο ομάδων απείχαν από τις ζωοτροφές (νηστεία). Ο πειραματικός σχεδιασμός για τα κοτόπουλα που λάμβαναν ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης περιγράφεται στην Εικόνα 18.

Οι δύο παραπάνω χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (30 και 50 ημέρες) επιλέχθηκαν για συγκεκριμένους σκοπούς. Αφ’ ενός στις 30 ημέρες από τη γέννηση των

κοτόπουλων οι αντιοξειδωτικοί τους μηχανισμοί δεν θεωρούνται ιδιαίτερα ανεπτυγμένοι, με αποτέλεσμα τα κοτόπουλα να είναι επιρρεπή σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (34) και αφ' ετέρου, οι 50 ημέρες επιλέχθηκαν αφού τα κοτόπουλα ήταν κοντά στην ηλικία που σφαγιάζονται για την κατανάλωση του κρέατός τους.

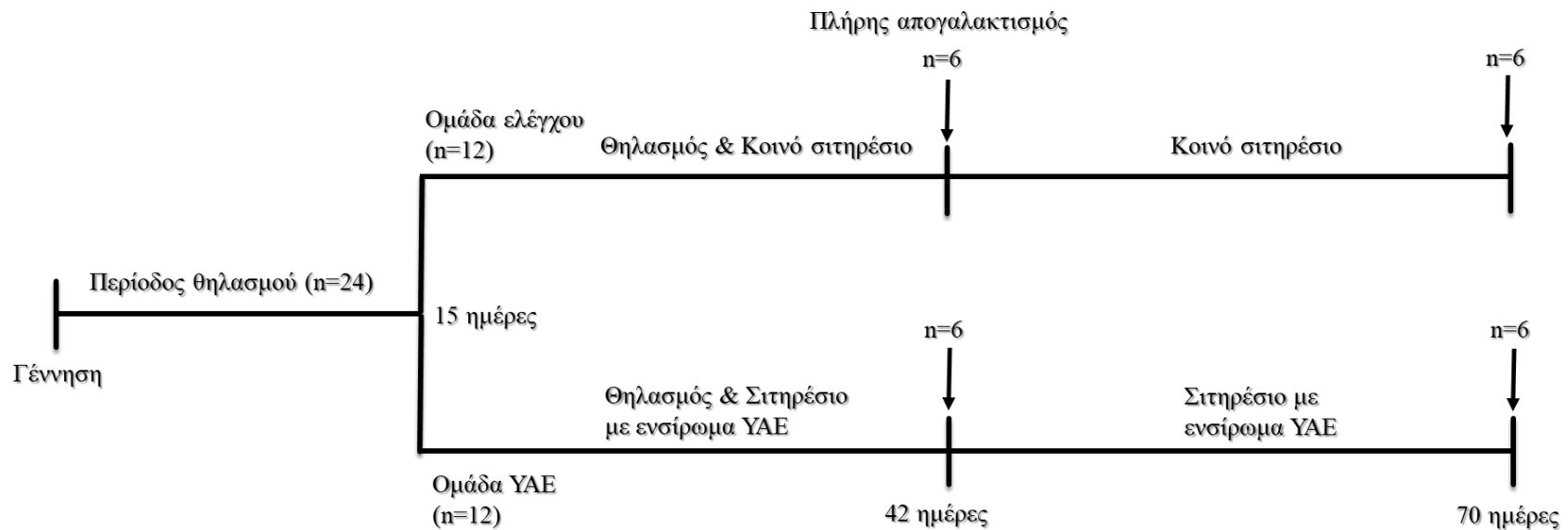


Εικόνα 18. Σχεδιασμός πειραμάτων με ενσίρωμα στεμφύλων στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν τη θανάτωση των ζώων στην αντίστοιχη χρονική στιγμή.

3.1.2. Πειραματικό πλάνο χορήγησης βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα ελαιοτριβείου σε νεαρά πρόβατα κρεοπαραγωγής

Παράλληλα με την εκτροφή των κοτόπουλων που η ζωοτροφή τους περιελάμβανε υποπροϊόντα οινοποίησης, σε ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών (ΙΕΖΠ) – ΕΛΓΟ ‘ΔΗΜΗΤΡΑ’ πραγματοποιήθηκε και η εκτροφή των προβάτων κρεοπαραγωγής, η διατροφή των οποίων έγινε σε συνθήκες φυσιολογικής διαβίωσης και ανάπτυξης. Τόσο οι συνθήκες αυτές όσο και ο τρόπος με τον οποίο, στη συνέχεια, τα πρόβατα θυσιάστηκαν για συλλογή αίματος και ιστών, διεξήχθησαν σύμφωνα με την Οδηγία της ΕΕ 2010/63 / ΕΕ για τα πειράματα σε ζώα. Συγκεκριμένα, 24 αρσενικά πρόβατα της ελληνικής φυλής Χίου επιλέχθηκαν από το κοπάδι του ΙΕΖΠ και μέχρι τις 15 ημέρες μετά τη γέννησή τους ήταν μαζί με τις μητέρες τους και λάμβαναν μητρικό γάλα. Την 16^η ημέρα, όπου ξεκίνησε η χορήγηση των βιολειτουργικών ζωοτροφών τα πρόβατα ζύγιζαν κατά μέσο όρο 7.99 ± 1.80 kg και χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ισάριθμες ομάδες (12 ζώα/ ομάδα): (α) η ομάδα ελέγχου, στην οποία χορηγήθηκε κοινό σιτηρέσιο και (β) η ομάδα ΥΑΕ, στην οποία χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα ελαιοτριβείου. Μέχρι και τις 42 ημέρες από τη γέννηση των προβάτων, όπου πραγματοποιήθηκε ο πλήρης απογαλακτισμός, τα αρνιά κάθε ομάδας παρέμεναν με τις μητέρες τους σε ξεχωριστούς κλωβούς (έναν για κάθε ομάδα) και είχαν *ad libitum* πρόσβαση τόσο στο μητρικό γάλα (θηλασμός), όσο και στις πειραματικές ζωοτροφές, σε σανό μηδικής και νερό. Στις μητέρες των δυο ομάδων χορηγήθηκε κοινή ζωοτροφή, χωρίς να έχουν πρόσβαση στη ζωοτροφή με το ενσίρωμα ΥΑΕ. Από τις 42 ημέρες, όπου τα ζώα απομακρύνθηκαν από τις μητέρες τους, μέχρι και το τέλος του πειράματος, είχαν αποκλειστικά πρόσβαση μόνο στις δύο πειραματικές ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ). Καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος υπολογίζονταν η κατανάλωση των ζωοτροφών και τα ζώα ζυγίζονταν εβδομαδιαίως για να υπολογιστεί το μέσο ημερήσιο κέρδος βάρους (g/ημέρα).

Συνολικά οι ζωοτροφές χορηγήθηκαν στα πρόβατα για διάστημα 55 ημερών, ενώ όλη η πειραματική διαδικασία διήρκησε 70 ημέρες. Ο πειραματικός σχεδιασμός φαίνεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19. Σχεδιασμός πειραμάτων με ενσίρωμα ΥΑΕ στα πρόβατα κρεοπαραγωγής. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν τη θανάτωση των ζώων στην αντίστοιχη χρονική στιγμή.

3.2. Συλλογή αίματος και ιστών

Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας των δυο πειραμάτων (κοτόπουλα και πρόβατα) πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από την σφαγίτιδα φλέβα τους και ταυτόχρονα συλλέχθηκαν και δείγματα ιστών:

- Στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής που χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα στεμφύλων λήφθηκαν 8 ιστοί προς μελέτη: καρδιά, ήπαρ, τετρακέφαλος μυς, νεφρός, πάγκρεας, σπλήνας, λεπτό έντερο και πνεύμονας.
- Στα πρόβατα κρεοπαραγωγής που χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα ΥΑΕ λήφθηκαν 5 ιστοί προς μελέτη: καρδιά, ήπαρ, τετρακέφαλος μυς, σπλήνας και εγκέφαλος.

Οι αιμοληψίες και ιστοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του πτηνοτροφείου του κ. Αγραφιώτη στον Τύρναβο και στις εγκαταστάσεις του ΙΕΖΠ για τα κοτόπουλα και τα πρόβατα, αντίστοιχα. Το συλλεχθέν αίμα αποθηκεύτηκε σε ειδικά σωληνάκια με 200μl EDTA 7.5%, ανακινήθηκαν απαλά μερικές φορές και τοποθετήθηκαν σε πάγο, ενώ οι ιστοί αποθηκεύτηκαν σε ειδικά κασετάκια και βυθίστηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο.

3.2.1. Επεξεργασία αίματος

Αμέσως μετά τη λήψη του ολικού αίματος, έγινε ο διαχωρισμός του σε πλάσμα και ερυθροκύτταρα (Red Blood Cell Lygate – RBCL), αφού το πρώτο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC), της υπεροξειδωσης λιπιδίων – TBARS και της οξειδωσης πρωτεϊνών μέσω των πρωτεϊνικών καρβονυλίων – CARB, ενώ το RBCL στη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης – GSH, και της ικανότητας διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).

Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός πλάσματος και ερυθροκυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (1370 g, 10 min, 4°C) και εν συνεχεία, το υπερκείμενο (πλάσμα) συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε σωληνάκια erpendorf τα οποία τοποθετήθηκαν στους -80°C για τις επόμενες μετρήσεις. Στο ίζημα (ερυθροκύτταρα) προστέθηκε απιονισμένο νερό (dH₂O) (αναλογία 1:1 v/v), ανακινήθηκε έντονα και τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν

ξανά (4000 g, 15 min, 4°C). Τέλος, σε νέα σωληνάκια erpendorf συλλέχθηκε το υπερκείμενο (RBCL), το οποίο φυλάχθηκε ομοίως στους -80°C για τις επόμενες μετρήσεις.

3.2.2. Ομογενοποίηση ιστών για τη μέτρηση βιοδεικτών

Όλοι οι ιστοί που λήφθηκαν τόσο από τα κοτόπουλα, όσο και από τα πρόβατα κρεοπαραγωγής ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικού ομογενοποιητή. Συγκεκριμένα, ποσότητα ίση ή μεγαλύτερη από 500 mg από κάθε ιστό αναμίχθηκαν με ποσότητα PBS σε αναλογία 1:3 (w/v), δηλαδή 1 μέρος ιστού και 2 μέρη PBS (138mM NaCl, 2,7mM KCl) στο οποίο διαλύθηκε μείγμα αναστολέων πρωτεασών (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH*). Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα επεξεργάστηκε με υπερήχους (1 min, 70% amplitude, 0.7 sec cycle) μέσω ειδικού μηχανήματος, ώστε να επιτευχθεί απελευθέρωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Ακολούθως, το ομογενοποίημα μετά τους υπερήχους φυγοκεντρήθηκε (15.000 g, 5 min, 4°C) και το υπερκείμενο κάθε ιστού που προέκυψε, συλλέχθηκε σε σωληνάκια erpendorf που αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Όλη η διαδικασία της ομογενοποίησης των ιστών πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά μέσα σε πάγο.

Τόσο η επεξεργασία των δειγμάτων αίματος, όσο και η ομογενοποίηση των ιστών πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.

3.3. Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα και στους ιστούς των ζώων

Η εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού προφίλ των ζώων πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού πέντε βιοδεικτών, από τους οποίους οι 3 σχετίζονται με την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο του αίματος όσο και των ιστών (επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης – GSH, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα – TAC και ικανότητα διάσπασης H_2O_2), ενώ οι υπόλοιποι 2 με την αποτίμηση των οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια (TBARS) και πρωτεΐνες (CARB).



Για την έκφραση των αποτελεσμάτων των δεικτών στο RBCL μετρήθηκε η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, ενώ στο πλάσμα και στους ιστούς η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

3.3.1. Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin – Hb) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Ο υπολογισμός της αιμοσφαιρίνης στο RBCL γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του hemiglobincyanide (HiCN) χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία). Συγκεκριμένα, 1 ml από το working reagent R1, με σύσταση: 0.60 mmol/l $C_6N_6FeK_3$, 0.90 mmol/l KCN, 2 mmol/l KH_2PO_4 (1:10 v/v, pH 7.3) προστέθηκαν σε 5μl RBCL όπως φαίνεται στον πίνακα 12 (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων - Hb

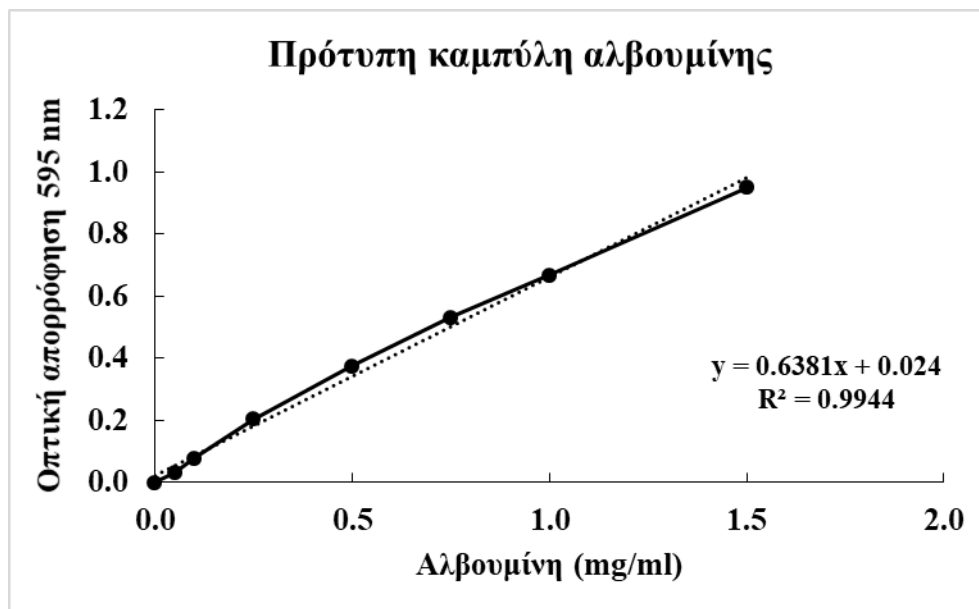
	Ποσότητα
Δείγμα (RBCL)	5 μl
R1	1.0 ml

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση με vortex, επώαση στο σκοτάδι για 10 min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 nm με χρήση πλαστικής κυψελίδας. Σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάκι που περιείχε μόνο 1 ml από το R1. Όλα τα δείγματα έγιναν σε τριπλέτες. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$Hb \left(\frac{g}{dl} \right) = (Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} - Abs_{\tau\upsilon\phi\lambda\omicron\upsilon}) \times 29.4$$

3.3.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford σε πλάσμα και ιστούς

Τόσο για τη μέτρηση των δεικτών που εφαρμόζονται στο πλάσμα του αίματος (TAC, TBARS και CARB), όσο και σε όλους τους βιοδείκτες που μετρήθηκαν στους ιστούς των ζώων (GSH, ρυθμός αποικοδόμησης H₂O₂, TAC, TBARS, CARB) ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης που περιέχεται σε αυτά. Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich, Μόναχο, Γερμανία). Πιο αναλυτικά, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που περιέχεται σε αυτό, έχει την ικανότητα σύνδεσης με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα δείγμα με αποτέλεσμα να παράγει ένα έγχρωμο μπλε προϊόν που απορροφά στα 595 nm. Συγκεκριμένα, 20 ml από δείγμα πλάσματος ή ιστού (με εύρος αραιώσεων 1:5 – 1:30 v/v) αναμιγνύονται με 980 μl αντιδραστηρίου Bradford. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύονται, επωάζονται στο σκοτάδι για 15 min και μετράται η οπτική τους απορρόφηση στα 595 nm με χρήση πλαστικής κυψελίδας. Σαν τυφλό χρησιμοποιήθηκε σωληνάκι που περιείχε 20 μl dH₂O ή 20 μl PBS για το πλάσμα και τους ιστούς αντίστοιχα, αντί για ποσότητα δείγματος, και 980 μl αντιδραστηρίου Bradford. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε τριπλέτες. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης γραμμική από 0,05 έως 1,5 mg/ml καταλήγοντας στην εξίσωση: $y = 0.6381x + 0.024$ (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

3.3.3. Μέτρηση επιπέδων Γλουταθειόνης

Το πειραματικό πρωτόκολλο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της GSH βασίζεται στην οξείδωσή της από το διθειοδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) που μετατρέπει την ανηγμένη της μορφή στην οξειδωμένη (GSSG) παράγοντας ταυτόχρονα μια έγχρωμη ουσία, το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ που απορροφά στα 412 nm.

Για τη μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης τόσο στο RBCL όσο και στα δείγματα των ιστών, απαιτείται καθαρισμός των δειγμάτων πριν την έναρξη της διαδικασίας:

3.3.3.1. Καθαρισμός RBCL

Οι πρωτεΐνες στα ερυθροκύτταρα κατακρημνίστηκαν δυο φορές με προσθήκη 5% τριχλωροοξικού οξέος (TCA) προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεϊνικές -SH ομάδες. Συγκεκριμένα, σε σωληνάκια erpendorf, 500 μl TCA 5% προστίθενται σε 500 μl RBCL και αναδεύονται με vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 min, 4 °C) και 300 μl από το υπερκείμενο συλλέγονται σε νέα σωληνάκια στα οποία προστίθενται και 90 μl TCA 5%. Τα δείγματα ανακινούνται ξανά με vortex και φυγοκεντρώνονται (15.000 g, 5 min, 4 °C). Το τελικό υπερκείμενο συλλέγεται εκ νέου σε σωληνάκια και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

3.3.3.2. Καθαρισμός ιστών

Σε σωληνάκια erpendorf προστίθενται 100 μl ομογενοποιημένου ιστού και 100 μl TCA 5%, αναδεύονται και φυγοκεντρώνται (15.000 g, 5 min, 4 °C). Το καθαρό πια υπερκείμενο συλλέγεται εκ νέου σε σωληνάκια και χρησιμοποιείται στη μέθοδο της GSH.



Η μέτρηση της γλουταθειόνης τόσο στο RBCL, όσο και στους ιστούς περιγράφηκε από τους Reddy και συνεργάτες (155). Πιο αναλυτικά, 20 μl RBCL ή ομογενοποιημένου ιστού προστίθενται σε 660 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,95) και 330 μl DTNB (1 mM σε 1% κιτρικό νάτριο w/v). Τα δείγματα αναμιγνύονται και επωάζονται στο σκοτάδι για 15 min και στη συνέχεια μετράται η οπτική απορρόφηση στα 412 nm. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται σωληνάκι που περιέχει 20 μl dH₂O ή PBS για το αιμόλυμα ή τον ιστό αντίστοιχα. Τα δείγματα μετρώνται σε τριπλέτες και η σειρά προθήκης των αντιδραστηρίων για το RBCL και τους ιστούς περιγράφονται στον πίνακα 13 (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων - GSH

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7.95)	660 μl	660 μl
Απεσταγμένο νερό / PBS	20 μl	—
RBCL/ομογενοποιημένος ιστός	—	20 μl
DTNB 1 mM	330 μl	330 μl
Όγκος αντίδρασης	1010 μl	1010 μl

- Τα αποτελέσματα στο RBCL εκφράστηκαν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$GSH \left(\frac{\mu mol}{g \text{ Hb}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} - Abs_{\tau\upsilon\phi\lambda\omicron\upsilon}}{13,6} \right) \times 262,6 \right] \times 1000}{Hb \left(\frac{g}{l} \right)}$$

Όπου:

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος RBCL.

Abs τυφλού: Η οπτική απορρόφηση του τυφλού δείγματος.

Διαιρούμε με 13,6 που είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB ($M^{-1} \times cm^{-1}$) Πολλαπλασιάζουμε με το 262,6: είναι η αραίωση που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (1010μl) με τον όγκο του RBCL (20μl) ($1010/20=50,5$), πολλαπλασιαζόμενο με 2, για να ληφθεί υπόψη η αρχική αραίωση με την προσθήκη dH₂O κατά τη διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων (1:1) (Βλέπε 3.2.1) και τέλος πολλαπλασιαζόμενο ξανά με το 2 και το 1,3 για να υπολογιστεί η αραίωση που έγινε κατά τον καθαρισμό με τις δύο προσθήκες του TCA (Βλέπε 3.3.3.1). πολλαπλασιάζοντας τελικά με 1000, μετατρέπουμε τα mmol/l σε μmol/l.

- Στους ιστούς η αντίστοιχη εξίσωση για την έκφραση των αποτελεσμάτων είναι η εξής:

$$GSH \left(\frac{\mu mol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} - Abs_{\tau\upsilon\phi\lambda\omicron\upsilon}}{13,6} \right) \times 2 \times 3 \times 50,5 \right]}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

Όπου:

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος του κάθε ιστού.

Abs τυφλού: Η οπτική απορρόφηση του τυφλού δείγματος.

Διαιρούμε με 13,6 που είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB ($M^{-1} \times cm^{-1}$) Πολλαπλασιάζουμε με 2, που είναι η αραίωση για τον καθαρισμό του ιστού (Βλέπε 3.3.3.2) με 5% TCA (1:1 v/v) και με 3, για να υπολογιστεί η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση (Βλέπε 3.2.2).

Το 50.5 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του ιστού (20 μL) ($1010/20=50,5$). Διαιρούμε με τα mg/ml πρωτεΐνης που

προκύπτουν από τη Bradford (Βλέπε 3.3.2) για να εκφραστεί η GSH σε $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης.

3.3.4. Ικανότητα διάσπασης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Η ικανότητα διάσπασης του H_2O_2 προσδιορίζεται μέσω της δραστηριότητας ενζύμων, όπως οι περοξειδοξίνες, που διασπούν το υπεροξείδιο σε νερό και οξυγόνο (156). Σε αυτή την κατηγορία ενζύμων ανήκει η καταλάση όπου η δραστηριότητά της αναφέρεται από τους Aebi και συνεργάτες (157). Συγκεκριμένα, για τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες, όπου 4 μl RBCL (1:10 v/v αραιώση με dH_2O) ή 4 - 40 μl ομογενοποιημένου ιστού (χωρίς αραιώση ή με αραιώση 1:3 – 1:10 v/v με PBS, αναλόγως του ιστού κάθε φορά) προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4), αναδεύονται με vortex και επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C για 10 min. Στη συνέχεια, σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 5 μl H_2O_2 (30%) και μετράται η μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm για 2 min. Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών προσαρμόζεται έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 3000 μl και όλα τα δείγματα μετρώνται σε τριπλέτες.

Η ικανότητα διάσπασης του H_2O_2 στο RBCL υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του } \text{H}_2\text{O}_2 \left(\frac{U}{\text{mg Hb}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right)}{40} \times 750 \times 10 \times 2 \times 1000$$

$$\text{Hb} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)$$

Όπου:

$\Delta \text{Abs} (\text{min})$ = η μεταβολή της απορρόφησης για κάθε δείγμα ανά λεπτό

40 = Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

750 = Ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3000 μL) με τον όγκο του RBCL (4 μL)

10 = προκύπτει από την 1:10 v/v αραιώση του RBCL

2 = προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων (Βλέπε 3.2.1)

Πολλαπλασιάζουμε με 1000 για τη μετατροπή mol/l σε $\mu\text{mol}/\text{ml}$

Οι αντίστοιχοι υπολογισμοί για τους ιστούς είναι:

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{U}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right)}{40} \times Y \times Z \times 3 \times 1000$$

$$\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

Όπου:

$\Delta \text{Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης για κάθε δείγμα ανά λεπτό

40 = Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Y = ο παράγοντας αραιώσης του ιστού στην αντίδραση που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3000 μL) με τον όγκο του ιστού, διαφορετικό κάθε φορά αναλόγως του ιστού (4-40 μL)

Z = η αραιώση αναλόγως του ιστού (1:3 – 1:10 v/v με PBS), αν απαιτείται

3 = η αραιώση που έγινε κατά την ομογενοποίηση των ιστών (Βλέπε 3.2.2)

1000 = για τη μετατροπή mol/l σε $\mu\text{mol/ml}$

3.3.5. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total antioxidant capacity – TAC)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος και των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό αυτών των δειγμάτων έχει αντιοξειδωτική δράση, παρ' όλα αυτά, κάθε ένα συνεισφέρει σε διαφορετικό βαθμό.

Ο προσδιορισμός της TAC βασίζεται στο πρωτόκολλο των Janaszewska και συνεργατών (158) με τη χρήση του DPPH[•], όπου παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας ανάγεται στην αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) και έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης που μετράται στα 520 nm. Αναλυτικότερα, 20 μl πλάσματος ή 40 μl ομογενοποιημένου ιστού (αραιώση 1:5 v/v) αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7,4) και 500 μl DPPH[•] (0,1 mM σε μεθανόλη). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 60 min. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 15000 g για 3 min σε RT και μετράται η οπτική απορρόφηση από το υπερκείμενο στα 520 nm. Σαν τυφλό χρησιμοποιείται δείγμα που περιέχει μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και το DPPH[•] και τα δείγματα μετρώνται σε τριπλέτες. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που προστίθενται στην αντίδραση για το πλάσμα και τους ιστούς περιγράφονται στους πίνακες 14 και 15 (Πίνακας 14, Πίνακας 15), αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Ποσότητες αντιδραστηρίων για το πλάσμα

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7.4)	500 μl	480 μl
DPPH 0.1 mM	500 μl	500 μl
Πλάσμα	—	20 μl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml

Πίνακας 15. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τους ιστούς

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7.4)	500 μl	460 μl
DPPH 0.1 mM	500 μl	500 μl
Ομογενοποιημένος ιστός (Αραίωση 1:5)	—	40 μl
Όγκος αντίδρασης	1 ml	1 ml

Η έκφραση των αποτελεσμάτων στο πλάσμα έγινε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\frac{\text{nmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100}\right) \times 50 \times 50}{1000}$$

Όπου:

$$\% \text{ μείωση Abs} = \frac{(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{μάρτυρα}}} \times 100$$

Διαιρούμε με 100 για να μετατρέψουμε το ποσοστό σε απλό αριθμό

50 = η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (μmol/l)

50 = η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα (1000 μl/20 μl)

1000 = η μετατροπή των l του πλάσματος σε ml

Για τους ιστούς η αντίστοιχη εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

$$\frac{\text{nmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100}\right) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5}{1000 \text{ Πρωτεΐνη } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)}$$

Όπου:

$$\% \text{ μείωση Abs} = \frac{(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{μάρτυρα}}} \times 100$$

Διαιρούμε με 100 για να μετατρέψουμε το ποσοστό σε απλό αριθμό

50 = η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα (μmol/l)

25 = η αραιώση του κάθε ιστού στην κυψελίδα (1000 μl/40 μl)

3 = η αραιώση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

5 = η αραιώση του δείγματος για τη μέθοδο

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ανά mg πρωτεΐνης / ml, οπότε διαιρούμε με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε ιστού όπως υπολογίστηκε με τη Bradford (Βλέπε [3.3.2](#))

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

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σχηματίζονται ενεργά και ασταθή υπεροξειδία λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης – οξείδωσης των λιπιδίων είναι η μηλονική διαλδεϋδη (Malondialdehyde, MDA). Τα TBARS μπορούν να εκφραστούν σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεϋδης, η οποία αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε αναλογία 1:2, δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 530 nm. Έτσι, τα TBARS χρησιμοποιούνται σαν δείκτης οξείδωσης των λιπιδίων.

Η μέθοδος προσδιορισμού των TBARS αναφέρεται από τους Keles και συνεργάτες (159). Συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15 ml), σε 100μl πλάσματος ή ομογενοποιημένου ιστού προστίθενται 500μl Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) και 500 μl 35% TCA. Τα δείγματα αναδεύονται και επώάζονται για 10 λεπτά σε RT. Μετά την επώαση προστίθεται 1 ml Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM) και ακολουθεί επώαση στους 95 °C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια οι σωλήνες falcon μεταφέρονται για 5 λεπτά στον πάγο και προσθέτουμε 1 ml TCA 70% και αναδεύουμε. Ένα ml από κάθε falcon μεταφέρεται σε σωληνάκια erpendorf τα οποία φυγοκεντρώνονται σε 11200 g για 3 λεπτά σε RT. Σαν τυφλό χρησιμοποιείται δείγμα το οποίο περιέχει όλα τα υπόλοιπα, αλλά στη θέση του πλάσματος ή του ιστού προστίθενται 100 μl dH₂O ή 100 μl PBS αντίστοιχα. Η οπτική απορρόφηση του υπερκειμένου μετράται στα 530 nm και κάθε δείγμα γίνεται εις τριπλούν.

Η εξίσωση για τον υπολογισμό των TBARS στο πλάσμα είναι:

$$TBARS \left(\frac{\mu mol}{l \text{ πλάσματος}} \right) = \left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31$$

Όπου:

0,156 = ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA σε $\mu\text{mol/l}$

31 = ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$)

Η εξίσωση στους ιστούς διαμορφώνεται ως εξής:

$$TBARS \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \left[\frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31 \times 3}{1000} \right] \times 1000$$

$$\frac{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Όπου:

0,156 = ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA σε $\mu\text{mol/l}$

31 = ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$)

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

Διαιρούμε με 1000 για τη μετατροπή $\mu\text{mol/l}$ σε $\mu\text{mol/ml}$ (γιατί η πρωτεΐνη εκφράζεται σε mg/ml) και τελικά πολλαπλασιάζουμε με 1000 για τη μετατροπή των μmol σε nmol .

3.3.7. Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB)

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα οξειδώνονται και δημιουργούνται οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, όπως για παράδειγμα αναστέλλουν την αντιγραφή και επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια λοιπόν, αποτελούν δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών, τα οποία έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με μια χρωστική ουσία, τη 2,4-δινιτρι-φαινυλδραζίνη (DNPH) σχηματίζοντας ένα έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 375 nm.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών μέσω των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αναφέρεται από τους Patsoukis και συνεργάτες (160). Πιο αναλυτικά, σε φιαλίδια erpendorf προστίθενται 50 μl πλάσματος ή ομογενοποιημένου ιστού και 50 μl TCA 20%, αναδεύονται με vortex και επωάζονται στον πάγο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται (15.000 g, 5 min, 4 °C) και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα (πλάσμα/ιστός) προστίθεται 0,5 ml

DNPH (10 mM διαλυμένο σε 2,5 N HCl) για τα δείγματα και 0,5 ml HCl (2.5 M) για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό, που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από τα 0.5 ml DNPH, τα οποία αντικαθίστανται με 0.5 ml HCl 2.5 N). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για μία ώρα στο σκοτάδι, με 15λεπτες αναδεύσεις. Μετά το πέρας της μιας ώρας τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις παραπάνω συνθήκες (15.000 g, 5 min, 4 °C) και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, 1000 μl TCA 10% προστίθενται στο ίζημα και τα δείγματα φυγοκεντρώνται (15.000 g, 5 min, 4 °C). Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, στα δείγματα (και στα τυφλά τους) προστίθενται 1000 μl διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα – αιθανόλης (αναλογία 1:1 v/v) και φυγοκεντρώνται ξανά (15.000 g, 5 min, 4 °C). Η πλύση με αυτό το διάλυμα πραγματοποιείται τρεις φορές με απομάκρυνση του υπερκειμένου κάθε φορά μετά τη φυγοκέντριση. Μετά την 3^η πλύση, στο ίζημα προστίθενται 1000 μl ουρίας (5 M, pH 2.3) και τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C για 15 λεπτά, αυστηρώς. Ακολουθεί η τελευταία φυγοκέντριση των δειγμάτων (15.000 g, 3 min, 4 °C) και η μέτρηση της οπτικής τους απορρόφησης στα 375 nm με κυψελίδα χαλαζία.

Η οξειδωση των πρωτεϊνών στο πλάσμα υπολογίζεται ως εξής:

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \times 20$$

Όπου:

0,022 = ο συντελεστής Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

20 = ο συντελεστής αραιώσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl/50 μl πλάσμα ή ιστός).

Διαιρούμε με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης κάθε δείγματος που προέκυψε από τη μέτρηση της Bradford (Βλέπε [3.3.2](#))

Η αντίστοιχη εξίσωση για τους ιστούς διαμορφώνεται ως εξής:

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \times 20 \times 3$$

Όπου:

0,022 = ο συντελεστής Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

20 = ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μ l/50 μ l πλάσμα ή ιστός).

3 = η αραίωση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

3.3.8. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 20.0 και χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένα one-way ANOVA test. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν το $p < 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος \pm SEM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Μελέτη της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στη δραστικότητα και την πρωτεϊνική έκφραση ενζύμων στους ιστούς κοτόπουλων και προβάτων κρεοπαραγωγής.

Στη συνέχεια της παρούσας διατριβής, έπειτα από τη διενέργεια των *in vivo* πειραμάτων με τη χορήγηση των δυο βιολειτουργικών ζωοτροφών σε παραγωγικά ζώα και τη μελέτη της επίδρασής τους στο αίμα και σε πληθώρα ιστών ζωτικών τους οργάνων, με τη μελέτη βιοδεικτών, ακολούθησε η επίδραση των εμπλουτισμένων ζωοτροφών στη δραστικότητα και την πρωτεϊνική έκφραση σημαντικών ενζύμων, στους ιστούς των ζώων, που συμβάλουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

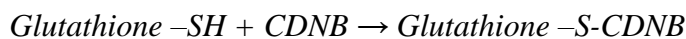
Σκοπός αυτού του μέρους ήταν να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος τι συμβαίνει σε κάθε διαφορετικό ιστό, πως επιδρούν δηλαδή οι πολυφαινόλες των ζωοτροφών με τα στέμφυλα και ΥΑΕ στη δραστικότητα ενζύμων όπως η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η λιγάση της γ-γλουταμιλοκυστεΐνης (γ-GCL). Τα ένζυμα αυτά είναι ιδιαίτερος σημαντικά αφού συμβάλουν στην αποτοξικοποίηση του οργανισμού, στην αναγωγή εν δυνάμει ελευθέρων ριζών καθώς και στο μονοπάτι σύνθεσης σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, όπως τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης που εκτιμήθηκαν στο προηγούμενο μέρος.

4.1. Ομογενοποίηση ιστών για τη μέτρηση δραστηριότητας των ενζύμων GST και SOD

Βλέπε 3.2.2. Τα δείγματα των ιστών που λήφθηκαν από το κάθε ζώο (κοτόπουλα / πρόβατα) ομογενοποιήθηκαν εκ νέου για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων της S – τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που έχει ήδη περιγραφεί, με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, για τις δυο μεθόδους ζυγίζουμε περίπου 300 – 400 mg από κάθε δείγμα, κάθε διαφορετικού ιστού των ζώων. Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται ο ιστός και ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.1 M, pH 7.4) σε αναλογία 1:5 (δλδ. για κάθε 100 mg ιστού που ζυγίζεται, προστίθενται 0,5 ml διάλυμα φωσφορικών) και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH*). Η ομογενοποίηση γίνεται μέσα σε πάγο με ειδικό ομογενοποιητή. Στη συνέχεια το ομογενοποίημα πια, επεξεργάζεται με υπερήχους για 1 λεπτό (cycle 0.7, amplitude % 70), φυγοκεντρείται (15.000 g, 15 λεπτά, 4 °C) και το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -80 °C για τις επόμενες μετρήσεις.

4.1.1. Δραστηριότητα της S – τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Glutathione S – Transferase, GST)

Γενικά, οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) αποτελούν μια οικογένεια ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών ισοενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, τα οποία συναντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (161). Είναι ένζυμα που συμβάλλουν στο μεταβολισμό και την αποτοξίνωση ενός ευρέως φάσματος ξενοβιοτικών ενώσεων και εμπλέκονται στον περιορισμό των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στους ιστούς ζώντων οργανισμών (95,111). Η GST έχει την ιδιότητα να καταλύει τη σύζευξη τέτοιων ξενοβιοτικών ουσιών με μια θειολική ομάδα της ανηγμένης γλουταθειόνης με σκοπό την απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό (162), σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο προσδιορισμός της GST γίνεται είτε με western blotting είτε πιο εύκολα μετρώντας την ενζυμική της δραστικότητα (163,164). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε φωτομετρικά η δραστικότητα της GST στα δείγματα που λήφθηκαν από ιστούς κοτόπουλων και προβάτων κρεοπαραγωγής που λάμβαναν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υποπροϊόντα οινοποίησης και ελαιοτριβείου. Η μέτρηση της δραστικότητας της GST στους ομογενοποιημένους ιστούς των ζώων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Habig και συνεργατών (165) και περιγράφηκε προηγουμένως από την ερευνητική μας ομάδα (95,166,167). Το 1-χλωρο,2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB) συνδέεται με τη GSH και παρατηρείται μια αύξηση στην απορρόφηση στα 340 nm. Συγκεκριμένα, πριν την έναρξη του πειράματος, τα σωληνάκια που θα χρησιμοποιηθούν επωάζονται κενά σε κλίβανο επώασης στους 37 °C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών προστίθενται διαδοχικά ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (880 – 920 μl) (0.1 M, pH=7.4), 50μl GSH (1mM διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) και 20μl CDNB (1mM διαλυμένο σε 95% καθαρή αιθανόλη). Ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο από τα σωληνάκια επιστρέφει σε κυψελίδα χαλαζία, όπου εκεί προστίθεται η ανάλογη ποσότητα για κάθε ιστό (10 – 50 μl ομογενοποιημένου ιστού) και μετράται η μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm για 3 λεπτά. Σαν τυφλό, χρησιμοποιείται σωληνάκι όπου αντί για τα μl ιστού προστίθενται 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και τα δείγματα μετρώνται εις τριπλούν.

Η εξίσωση για τη δραστικότητα της GST στους ιστούς διαμορφώνεται ως εξής:

$$\text{Δραστικότητα GST} \left(\frac{U}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{340 \text{ nm}}}{min} \right)}{0.0096} \times \left(\frac{1000}{y} \right) \frac{mg}{ml}$$

Όπου:

$$\left(\frac{\Delta Abs_{340 \text{ nm}}}{min} \right) = \frac{Abs_{3 \text{ min}} - Abs_{0 \text{ min}}}{3 \text{ min}}$$

Abs_{3min} = η τιμή της απορρόφησης του δείγματος στα 3 λεπτά

Abs_{0min} = η τιμή της απορρόφησης του δείγματος μετά το πέρας των 3 λεπτών

0,0096 = ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του CDNB σε μM⁻¹/cm

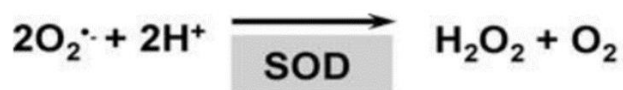
1000 (μl) = ο όγκος της αντίδρασης

y (μl) = ο όγκος του δείγματος από τον κάθε ιστό (10 – 50 μl)

Διαιρούμε με την αντίστοιχη τιμή της πρωτεΐνης κάθε ιστού όπως αυτή έχει προσδιοριστεί με τη μέτρηση της Bradford (Βλέπε 3.3.2).

4.1.2. Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD)

Η SOD είναι το ένζυμο που ανάγει τη ρίζα του σουπεροξειδίου σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως φαίνεται παρακάτω:



Ο προσδιορισμός της σουπεροξειδικής δισμουτάσης μπορεί να γίνει είτε μέσω μέτρησης της δραστικότητάς της είτε με western blotting. Στην πρώτη περίπτωση, για τον υπολογισμό της δραστικότητας του ενζύμου, η ξανθίνη και η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου - $\text{O}_2^{\cdot-}$ και το nitroblue tetrazolium – NBT ως δείκτης παραγωγής $\text{O}_2^{\cdot-}$. Η SOD ανταγωνίζεται με το NBT για την εξουδετέρωση του $\text{O}_2^{\cdot-}$. Άρα το ποσοστό αναστολής του NBT που συμμετέχει στην εξουδετέρωση της ρίζας, είναι ένα μέτρο της δραστικότητας της SOD (168).

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD μετρήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Oberley και συνεργατών (169) και περιγράφηκε από την ερευνητική μας ομάδα (95,166,167). Η διαδικασία ξεκινά πρώτα με τη μέτρηση του τυφλού, όπου σε σωληνάκια erpendorf προστίθενται αρχικά 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος SOD [(1 mM δι-εθυλεν-τριαμινο-πενταοξικό οξύ – DETAPAC, διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.05M, pH 7.8), NBT (56 μM) και ξανθίνη (0,1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Μισούρι, ΗΠΑ)] και 100 μl DETAPAC. Τα σωληνάκια αναδεύονται, το περιεχόμενό τους επιστρέφει στην κυψελίδα και το φωτόμετρο μηδενίζεται στα 560 nm. Στη συνέχεια, στην κυψελίδα προστίθενται 100 μl του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (60 mU), αναδεύεται με χρήση πάραφιλμ και μετράται η μεταβολή απορρόφησης στα 560 nm. Αφού ολοκληρωθεί η μέτρηση του τυφλού, ακολουθεί η μέτρηση των δειγμάτων, όπου σε 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος SOD προστίθενται 100 μl ομογενοποιημένου ιστού, αντί

για DETAPAC και ακολουθείται η διαδικασία φωτομέτρησης όπως παραπάνω. Τα δείγματα μετρώνται εις τριπλούν και εκφράζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta\text{ραστικότητα SOD (\%)} = 100 - \left(\frac{\left(\frac{\Delta\text{A560}_{\text{nm}}}{\text{min τυφλού}} - \frac{\Delta\text{A560}_{\text{nm}}}{\text{min δείγματος}} \right) \times 100}{\frac{\Delta\text{A560}_{\text{nm}}}{\text{min blank}}} \right) \frac{\text{Πρωτεΐνη (mg)}}{\text{ml}}$$

Όπου:

$$\Delta\text{A560 nm/min τυφλού} = \frac{\text{Abs τυφλού}_{3 \text{ min}} - \text{Abs τυφλού}_{0 \text{ min}}}{3 \text{ min}}$$

Abs τυφλού_{3min} = η τιμή της απορρόφησης του τυφλού στα 3 λεπτά

Abs τυφλού_{0min} = η τιμή της απορρόφησης του τυφλού μετά το πέρας των 3 λεπτών

$$\Delta\text{A560 nm/min δείγματος} = \frac{\text{Abs δείγματος}_{3 \text{ min}} - \text{Abs δείγματος}_{0 \text{ min}}}{3 \text{ min}}$$

Abs δείγματος_{3min} = η τιμή της απορρόφησης του δείγματος στα 3 λεπτά

Abs δείγματος_{0min} = η τιμή της απορρόφησης του δείγματος μετά το πέρας των 3 λεπτών

Πολλαπλασιάζουμε με 100 και διαιρούμε με την ποσότητα πρωτεΐνης του κάθε δείγματος, για να υπολογίσουμε το ποσοστό αναστολής του NBT.

4.2. Ομογενοποίηση ιστών για την πρωτεϊνική έκφραση της γ – GCL

Βλέπε 3.2.2. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου ομογενοποίηση όλων των ιστών που συλλέχθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων, και από τα δύο ζωικά είδη (κοτόπουλα και πρόβατα) για την μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της λιγάσης της γ -γλουταμιλοκυστεΐνης (γ – GCL). Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι η αναλογία ιστού:PBS ήταν 1:10, δηλαδή για κάθε 100 mg ιστού που ζυγίζονται, προστίθενται 1000 μ l PBS με αναστολείς πρωτεασών (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH*). Οι συνθήκες και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια όπως περιγράφεται προηγουμένως: επεξεργασία με υπερήχους (1 λεπτό, cycle 0.7, amplitude % 70), φυγοκέντριση (15.000 g, 15 λεπτά, 4 °C) και συλλογή - αποθήκευση

υπερκειμένου στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τις μετρήσεις. Η ομογενοποίηση γίνεται πάντα μέσα σε πάγο.

4.2.1. Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της λιγάσης της γ – γλουταμιλοκυστεΐνης (γ – GCL)

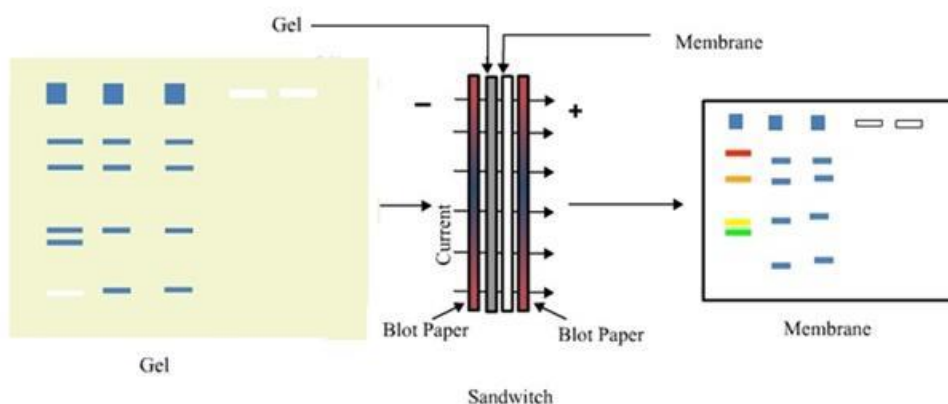
Η γ – GCL είναι το πρώτο ένζυμο που ρυθμίζει και καθορίζει τη σύνθεση της γλουταθειόνης. Κρίνεται σημαντικό λοιπόν να μελετηθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασής της σε επίπεδο ιστών για να σχηματιστεί μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για το οξειδοαναγωγικό προφίλ του κάθε οργάνου.

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της γ -GCL έγινε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, ή αλλιώς Western blot. Αποτελεί την πιο συχνή και ευρέως διαδεδομένη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών με βάση την ικανότητα σύνδεσής τους με ειδικά αντισώματα, και περιγράφεται για πρώτη φορά από τους Towbin και συνεργάτες (170). Η διαδικασία της western blot αποτελείται από 3 φάσεις:

α). διαχωρισμός των προς μελέτη πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, β). μεταφορά των πρωτεϊνών σε στερεό υπόστρωμα και γ). σήμανση των πρωτεϊνών με τα κατάλληλα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.

Η πρώτη φάση αφορά την προετοιμασία των πηκτωμάτων και των δειγμάτων για την SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση. Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% στο οποίο θα φορτωθούν και θα τρέξουν στη συνέχεια τα δείγματα των ιστών. Κατά τη διάρκεια που απαιτείται ώστε τα πηκτώματα να πήξουν, πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, 30 και 50 μg πρωτεΐνης (έχει υπολογιστεί προηγουμένως με τη μέθοδο Bradford) από τον κάθε ομογενοποιημένο ιστό των προβάτων και των κοτόπουλων αντίστοιχα, αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer 5x) με SDS, γλυκερόλη και β -μερκαπτοαιθανόλη (BME). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 3 λεπτά στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τα δείγματα φορτώνονται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE για 45 – 60 λεπτά στα 150 V, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Μαζί με τα δείγματα, σε ένα πηγαδάκι, φορτώνεται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους, ο οποίος καθορίζει το μοριακό βάρος των άλλων πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Το μέγεθος της κάθε πρωτεΐνης υπολογίζεται σε kDa.

Η δεύτερη φάση αφορά τη διαδικασία της μεμβρανικής μεταφοράς των πρωτεϊνικών ζωνών σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF). Έτσι, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται σε μια ειδική κασετίνα με την εξής σειρά: σφουγγάρι, διηθητικό χαρτί Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη PVDF, χαρτί Whatman, σφουγγάρι. Η σύνθεση τοποθετείται στη συνέχεια σε συσκευή ηλεκτροφόρησης για 2 ώρες στα 110 V. Όλη η διαδικασία της μεταφοράς γίνεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Η διάταξη περιγράφεται στην Εικόνα 21. Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη μπλοκάρεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών αποβουτυρωμένου γάλακτος (5% w/v) διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST (Tris, NaCl, TWEEN 20) και αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.



Εικόνα 21. Διάταξη και απεικόνιση της διαδικασίας μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην μεμβράνη PVDF.

Η τρίτη φάση αφορά τη σήμανση των πρωτεϊνών με τα κατάλληλα αντισώματα. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη επωάζεται για μία ώρα σε διάλυμα TBST με 5% w/v αποβουτυρωμένο γάλα με το πρωτογενές αντίσωμα της γ - GCL (anti- γ -GCL, αραιώση 1:600), το οποίο αναγνωρίζει την αμινοξική αλληλουχία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, και στη συνέχεια ακολουθούν 5 5λεπτες πλύσεις με σκέτο διάλυμα TBST ώστε να απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα που δεν έχει δεσμευτεί μετά την επώαση. Ύστερα από τις πλύσεις, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit, αραιώση 1:5000) για διάρκεια 30 λεπτών έως μίας ώρας, σε διάλυμα TBST με 5% w/v αποβουτυρωμένο γάλα. Το δευτερογενές αντίσωμα έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει το πρωτογενές και να συνδέεται σε αυτό. Έπειτα ακολουθούν 3 πλύσεις της

μεμβράνης για 15 λεπτά μόνο με TBST για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος, όπως και προηγουμένως. Τέλος, η κάθε μεμβράνη, αφού στεγνώσει από το TBST, εκτίθεται στο αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας (chemiluminescence – ECL) για 1 λεπτό και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη ώστε η ανίχνευση των ζωνών των πρωτεϊνών να γίνει μέσω έκθεσης της μεμβράνης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, αραιώση 1:10000) χρησιμοποιείται σαν μόριο κανονικοποίησης. Η διαδικασία της εμφάνισης πραγματοποιείται σε σκοτεινό χώρο με κόκκινη λάμπα υπέρυθρου φωτός. Ο χρόνος που η μεμβράνη εκτίθεται στο φιλμ επηρεάζεται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος που θα δώσει (1-3 λεπτά έκθεσης). Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε μέσω του λογισμικού Alpha Innotech.

4.3. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση της δραστικότητας και των πρωτεϊνικών επιπέδων των προαναφερθέντων ενζύμων, αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 20.0. συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε one-way ANOVA test. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν το $p < 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος \pm SEM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – Αποτελέσματα της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο αίμα και σε ιστούς από κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής

Σε αυτό το κομμάτι της διδακτορικής διατριβής περιγράφεται η επεξεργασία και ο σχολιασμός όλων των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν τόσο στις βιολειτουργικές ζωοτροφές (στεμφύλων και ΥΑΕ), όσο και στα δείγματα αίματος και ιστών των παραγωγικών ζώων (κοτόπουλα και πρόβατα αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα που αφορούν:

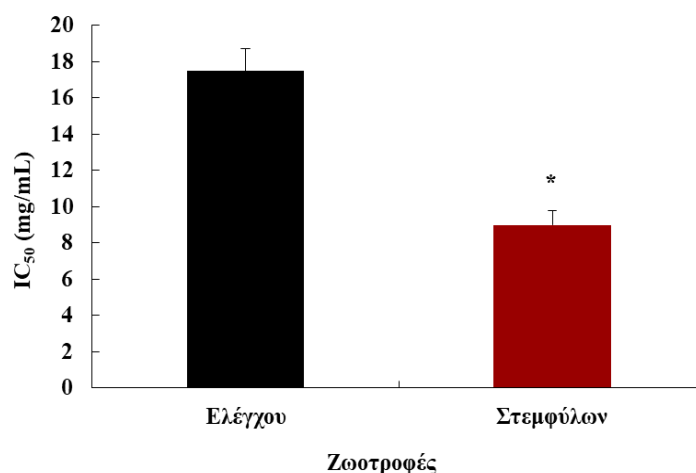
- την αντιοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων ζωοτροφών με υποπροϊόντα οινοποίησης και ελαιοτριβείων, μέσω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες
- τη μεταβολή της κατανάλωσης τροφής και του βάρους των ζώων μεταξύ των ομάδων ελέγχου και στεμφύλων – ΥΑΕ.
- τη μέτρηση βιοδεικτών στο αίμα και στους ιστούς των ζώων που αφορούν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση
- τη μέτρηση της δραστηριότητας και της πρωτεϊνικής έκφρασης σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων στα δείγματα των ιστών των ζώων.

Ο σχολιασμός και η ανάλυση των αποτελεσμάτων στόχο έχει να εμπλουτίσει την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αφού σε προηγούμενες έρευνες δεν έχει μελετηθεί εν τω βάθει τόσο μεγάλη ποικιλία σε βιοδείκτες και ιστούς, και δη σε επίπεδο παραγωγικών ζώων και όχι πειραματοζώων, που η κατανάλωσή τους σχετίζεται άμεσα με τον άνθρωπο.

5.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών

5.1.1. Αντιοξειδωτική δράση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης – Στεμφύλα

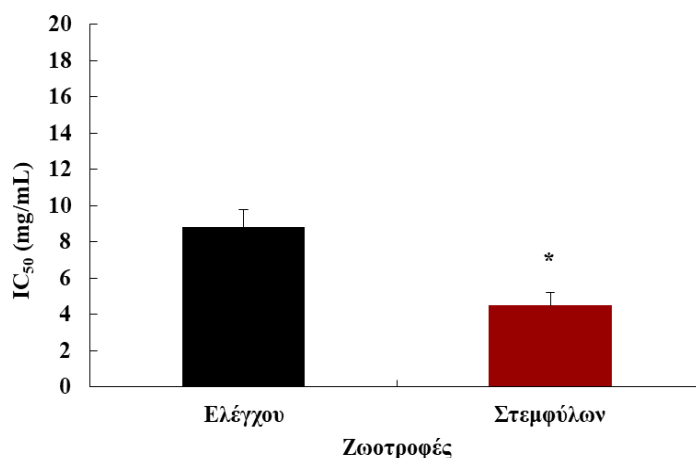
5.1.1.1. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH•



Διάγραμμα 1. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και στεμφύλων) που χορηγήθηκαν στα νεαρά κοτόπουλα. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο Διάγραμμα 1 εξετάστηκαν οι τιμές IC₅₀ για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• μεταξύ της ζωοτροφής που χορηγήθηκε στην ομάδα ελέγχου και εκείνης που χορηγήθηκε στα κοτόπουλα της ομάδας στεμφύλων και ήταν εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης. Η τιμή IC₅₀ αντιπροσωπεύει την *in vitro* ικανότητα μιας ουσίας να αναστέλλει τη ρίζα του DPPH• στο 50%. Είναι γνωστό πως όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει η εξεταζόμενη ουσία (171,172). Από το διάγραμμα 1 φάνηκε ότι η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποίησης παρουσίασε διπλάσια αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με εκείνη της ομάδας ελέγχου, αφού η τιμή IC₅₀ της ομάδας στεμφύλων, ήταν, περίπου, δυο φορές χαμηλότερη από την τιμή της ομάδας ελέγχου κατά 48,6%.

5.1.1.2. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•

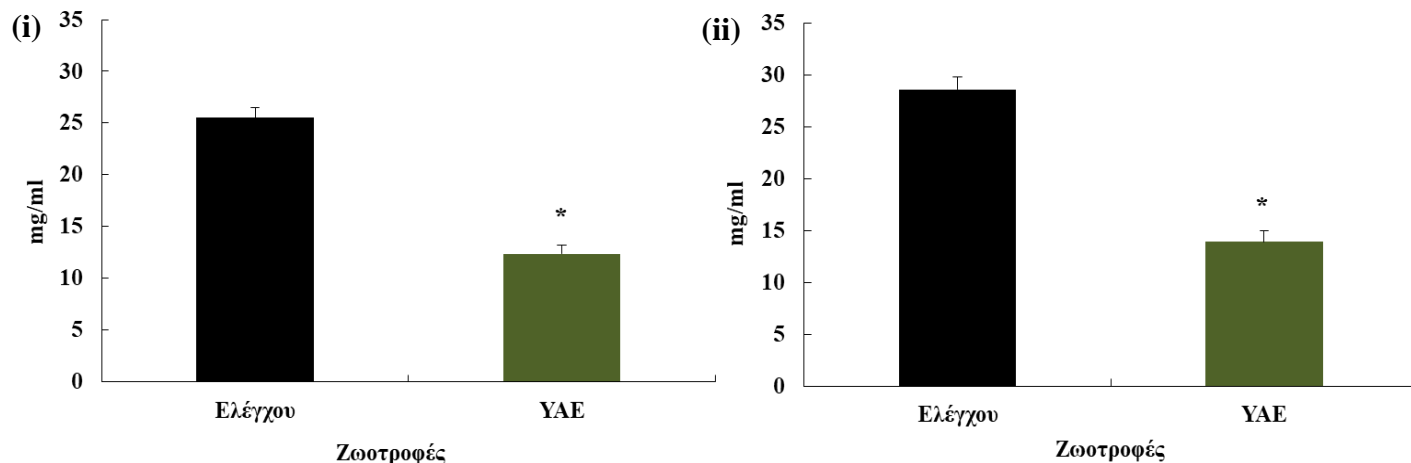


Διάγραμμα 2. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και στεμφύλων) που χορηγήθηκαν στα νεαρά κοτόπουλα. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο Διάγραμμα 2 εξετάστηκαν οι τιμές IC₅₀ για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS• μεταξύ της ζωοτροφής που χορηγήθηκε στην ομάδα ελέγχου και εκείνης που χορηγήθηκε στα κοτόπουλα της ομάδας στεμφύλων και ήταν εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ μιας εξεταζόμενης ουσίας, τόσο μεγαλύτερη αναστολή της ρίζας έχει και άρα τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Από το διάγραμμα 2 φαίνεται ότι η ζωοτροφή της ομάδας στεμφύλων παρουσίασε μια τιμή IC₅₀ στα 4,5 mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου είχε τιμή IC₅₀ ίση με 8,8 mg/ml. Η ζωοτροφή δηλαδή που ήταν εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης και χορηγήθηκε στη συνέχεια στα κοτόπουλα που αποτέλεσαν την ομάδα των στεμφύλων, εμφάνισε κατά δύο φορές μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS• σε σχέση με εκείνη τη ζωοτροφή που παρασκευάστηκε για να χορηγηθεί στα κοτόπουλα που εν συνεχεία αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου.

5.1.2. Αντιοξειδωτική δράση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

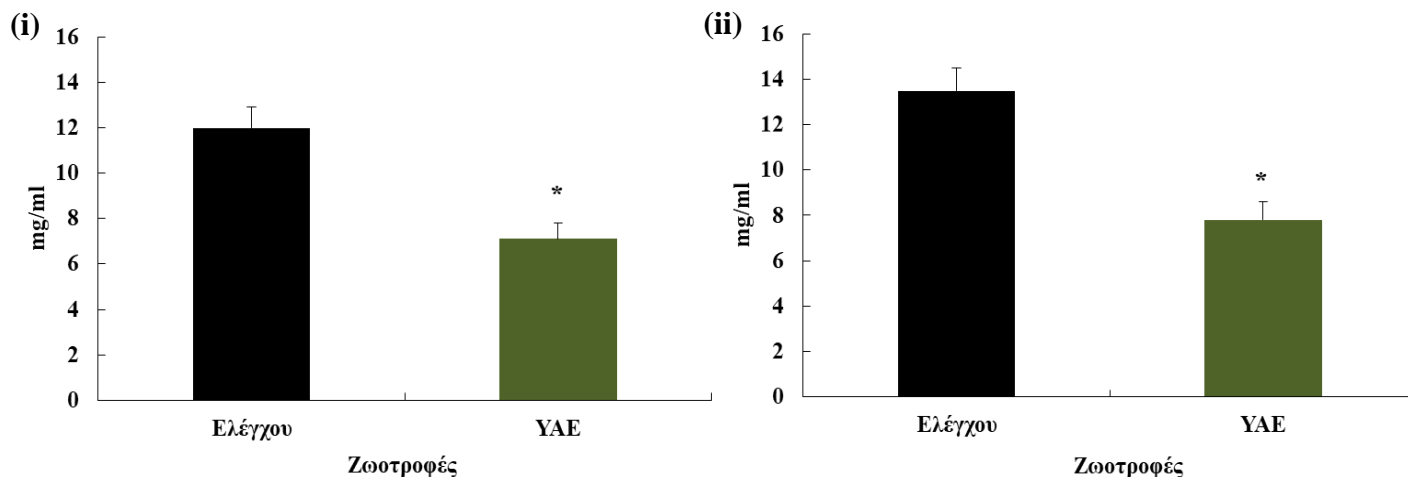
5.1.2.1. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH*



Διάγραμμα 3. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH* ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ) που χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα (i) πριν τη φάση του απογαλακτισμού και (ii) μετά τον απογαλακτισμό. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας DPPH* από τις δυο πειραματικές ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ) που εν συνεχεία χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα. Το διάγραμμα 3(i) αφορά τη σύγκριση της ικανότητας εξουδετέρωσης του DPPH* μεταξύ των δυο ομάδων πριν τον απογαλακτισμό (μέχρι 42 ημέρες από τη γέννηση), ενώ το διάγραμμα 3(ii) αφορά τη σύγκριση μετά τον απογαλακτισμό (από 42 έως 70 ημέρες από τη γέννηση). Έτσι, τόσο πριν, όσο και μετά τον απογαλακτισμό η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα ΥΑΕ παρουσίασε σχεδόν δυο φορές σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH*, και άρα υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τη κοινή ζωοτροφή. Στατιστικώς σημαντικές αλλαγές μεταξύ των δυο χρονικών στιγμών (42 και 70 ημέρες) δεν παρατηρήθηκαν.

5.1.2.2. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS*



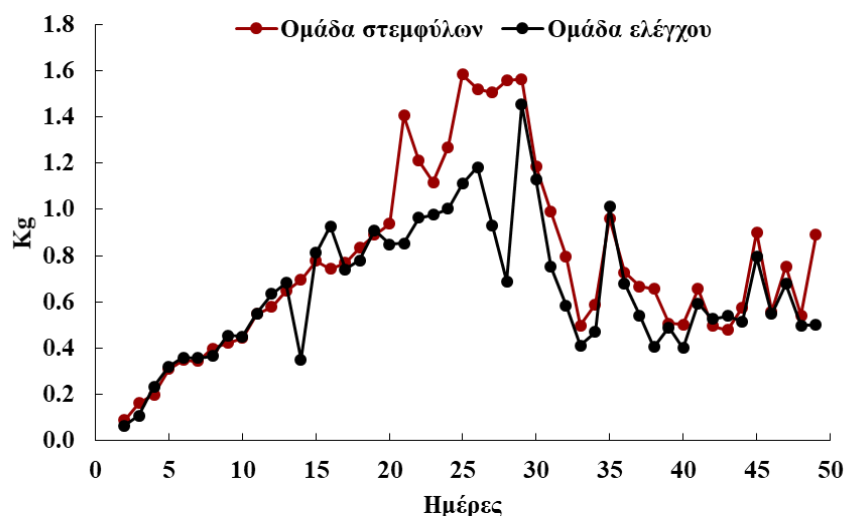
Διάγραμμα 4. Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS* ανάμεσα στις δυο ζωοτροφές (ελέγχου και YAE) που χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα (i) πριν τη φάση του απογαλακτισμού και (ii) μετά τον απογαλακτισμό. *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 4 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας ABTS* από τις δυο πειραματικές ζωοτροφές (ελέγχου και YAE) που εν συνεχεία χορηγήθηκαν στα νεαρά πρόβατα. Το διάγραμμα 4(i) αφορά τη σύγκριση της ικανότητας εξουδετέρωσης του ABTS* μεταξύ των δυο ομάδων πριν τον απογαλακτισμό (μέχρι 42 ημέρες από τη γέννηση), ενώ το διάγραμμα 4(ii) αφορά τη σύγκριση μετά τον απογαλακτισμό (από 42 έως 70 ημέρες από τη γέννηση). Έτσι, τόσο πριν, όσο και μετά τον απογαλακτισμό η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα YAE παρουσίασε σχεδόν δυο φορές σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS*, και άρα υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το κοινό σιτηρέσιο. Στατιστικά σημαντικές αλλαγές μεταξύ των δυο χρονικών στιγμών (42 και 70 ημέρες) δεν παρατηρήθηκαν.

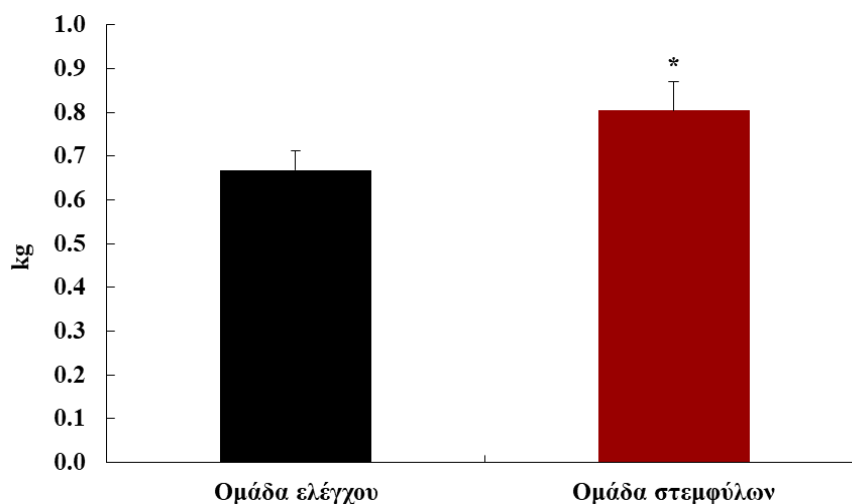
5.2. Παραγωγικά στοιχεία των δύο ζωικών ειδών

5.2.1. Κοτόπουλα – Στέμφυλα

5.2.1.1. Κατανάλωση ζωοτροφών



Διάγραμμα 5. Ημερήσια κατανάλωση των δύο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) από την έναρξη (ημέρα 2) μέχρι τη λήξη του πειράματος (ημέρα 50).

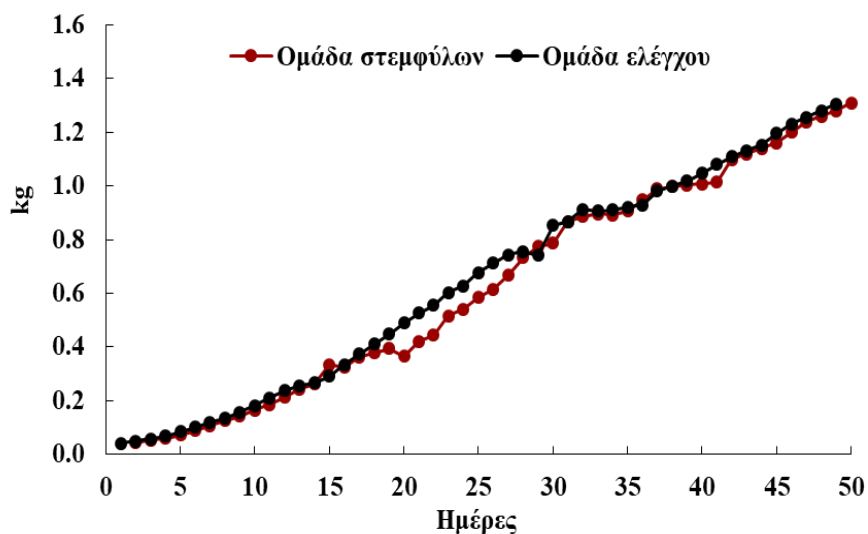


Διάγραμμα 6. Μέση κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) από τα κοτόπουλα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

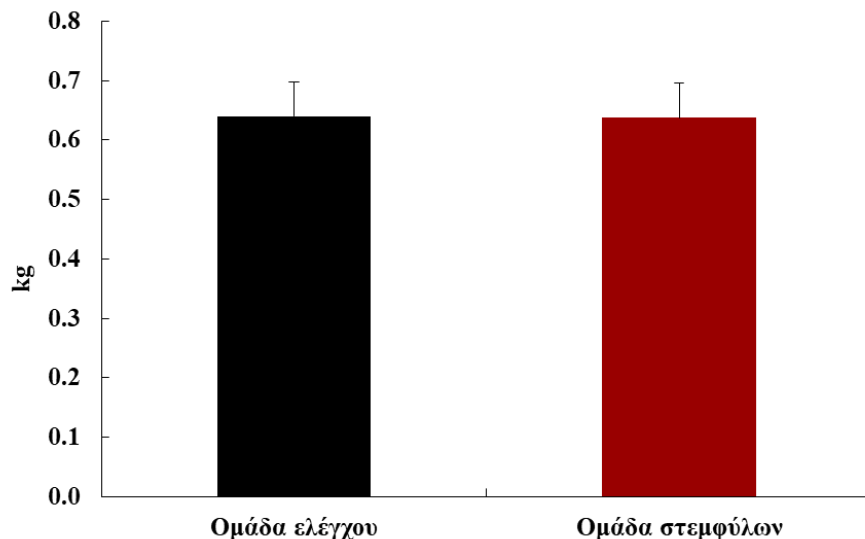
Στα διαγράμματα 5 και 6 απεικονίζεται η μεταβολή της κατανάλωσης των ζωοτροφών από τις δυο πειραματικές ομάδες, τόσο σε ημερήσια βάση (Διάγραμμα 5), όσο και κατά μέσο όρο στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (50 ημέρες) (Διάγραμμα 6). Η τιμή της κατανάλωσης των ζωοτροφών προέκυψε αφαιρώντας το απόβαρο (δλδ. το

βάρος από την ταΐστρα της κάθε ομάδας, πριν προστεθεί νέα ποσότητα ζωοτροφής), από το μεικτό της βάρος (δλδ. το βάρος της κάθε ταΐστρας μαζί με την ποσότητα των ζωοτροφών). Συνολικά, στο τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην κατανάλωση της ζωοτροφής της ομάδας στεμφύλων κατά 20,4 % ($p=0.043$)

5.2.1.2. Μεταβολή του βάρους των πουλερικών



Διάγραμμα 7. Ημερήσια μεταβολή του βάρους των πουλερικών μεταξύ των δυο πειραματικών ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) από την έναρξη (ημέρα 2) μέχρι τη λήξη του πειράματος (ημέρα 50).

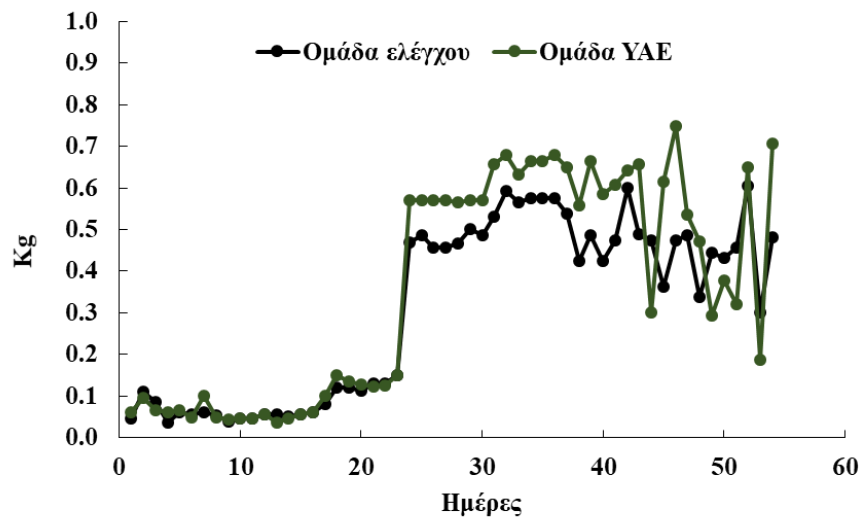


Διάγραμμα 8. Μέση μεταβολή του βάρους των πουλερικών μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

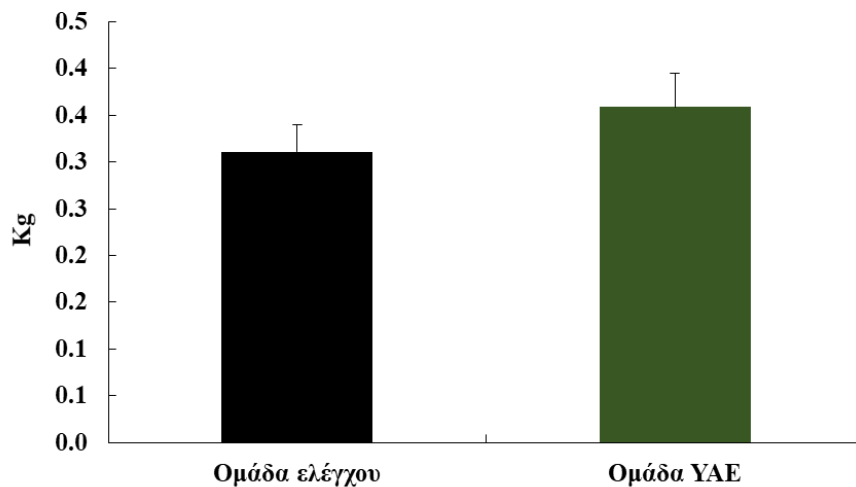
Στα διαγράμματα 7 και 8 απεικονίζεται η μεταβολή του βάρους των πουλερικών τόσο σε ημερήσια βάση (διάγραμμα 7), όσο και συνολικά σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 8). Από τα διαγράμματα φάνηκε ότι το βάρος από τα κοτόπουλα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ($p > 0.05$), από την αρχή (ημέρα γέννησης: 2) μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα: 50) μεταξύ της ομάδας που λάμβανε τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης και αυτής που λάμβανε το κοινό σιτηρέσιο. Να σημειωθεί ότι τα κοτόπουλα ζυγίζονταν στην αρχή κάθε ημέρας πριν την ανανέωση της τροφής τους.

5.2.2. Πρόβατα – Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

5.2.2.1. Κατανάλωση ζωοτροφών



Διάγραμμα 9. Ημερήσια κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) από τα πρόβατα, κατά την έναρξη χορήγησης της τροφής (ημέρα 16 – σημείο 0) έως το τέλος του πειράματος (ημέρα 70).

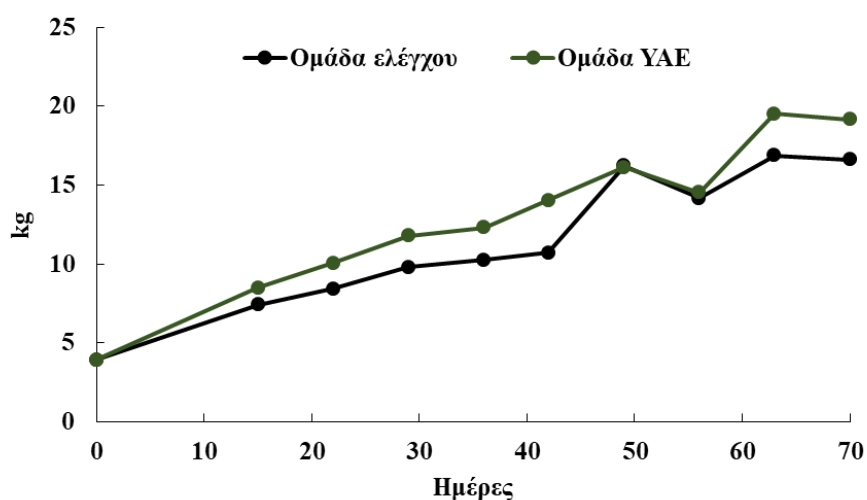


Διάγραμμα 10. Μέση κατανάλωση των πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) από τα πρόβατα, κατά την έναρξη χορήγησης της τροφής (ημέρα 16) έως το τέλος του πειράματος (ημέρα 70).

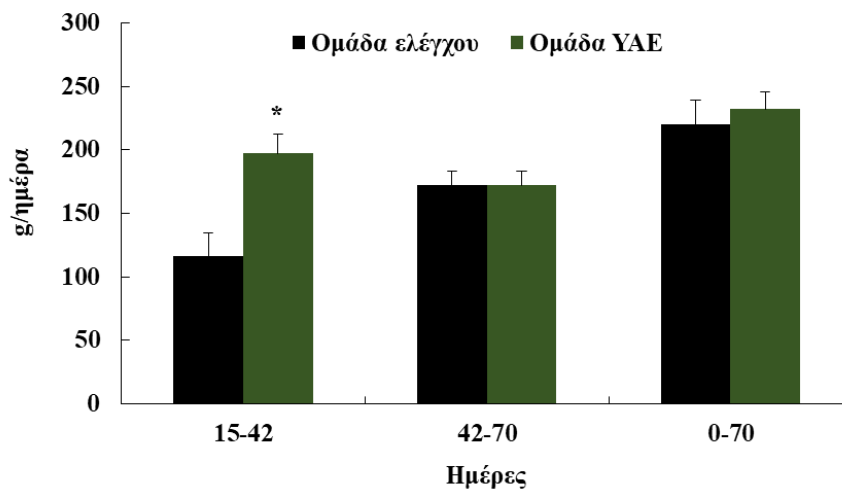
Στα διαγράμματα 9 και 10 απεικονίζεται η μεταβολή στην κατανάλωση των δυο πειραματικών ζωοτροφών που χορηγήθηκαν στα πρόβατα (ελέγχου και ΥΑΕ) από τις 15 ημέρες της γέννησής τους μέχρι το τέλος της πειραματικής χορήγησης, δηλαδή, 70 ημέρες από τη γέννηση των προβάτων (μέχρι τις 15 ημέρες λάμβαναν μητρικό γάλα). Στο

Διάγραμμα 9 φαίνεται η ημερήσια κατανάλωση της τροφής από τις δυο ομάδες, ενώ στο Διάγραμμα 10 απεικονίζεται η μέση κατανάλωσή τους από την ημέρα 16 μέχρι την ημέρα 70, το διάστημα δηλαδή που τα πρόβατα λάμβαναν τις δυο πειραματικές ζωοτροφές (54 ημέρες κατανάλωσης). Και από τα δυο διαγράμματα φάνηκε ότι τελικά δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική μεταβολή της κατανάλωσης των τροφών μεταξύ της ομάδας που λάμβανε το σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και της ομάδας που λάμβανε το κοινό σιτηρέσιο.

5.2.2.2. Μεταβολή του βάρους των προβάτων



Διάγραμμα 11. Ημερήσια μεταβολή σωματικού βάρους των αμνών μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



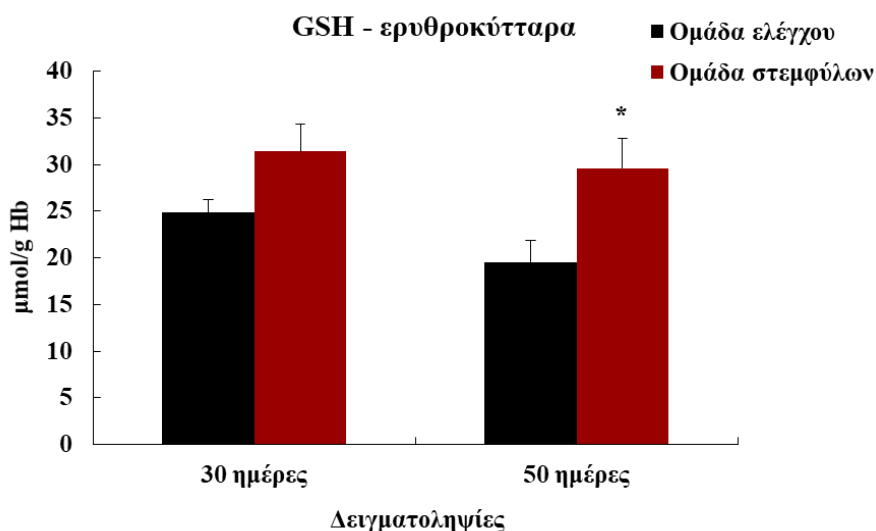
Διάγραμμα 12. Μέσο ημερήσιο κέρδος βάρους των αμνών (average daily gain) μεταξύ των δυο ομάδων (ελέγχου και YAE) σε κάθε ξεχωριστό στάδιο δειγματοληψίας. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 11 και 12 απεικονίζεται η μεταβολή του σωματικού βάρους των προβάτων τόσο ημερησίως (Διάγραμμα 11) από την έναρξη του πειράματος (ημέρα 0= ημέρα γέννησης) μέχρι το τέλος (ημέρα 70), όσο και κατά μέσο όρο (Διάγραμμα 12) στα χρονικά διαστήματα λήψης των δυο ζωοτροφών (15-42 και 42-70 ημέρες) καθώς και συνολικά (0-70 ημέρες). Και από τα δυο διαγράμματα φάνηκε ότι στο σύνολο της διάρκειας του πειράματος δεν υπήρχε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στο βάρος των αμνών μεταξύ των δύο ομάδων. Όμως όταν υπολογίστηκε επιμέρους η μεταβολή του βάρους, παρατηρήθηκε ότι κατά το πρώτο χρονικό διάστημα χορήγησης των ζωοτροφών (15-42 ημέρες), το βάρος των προβάτων που σιτίζονταν με τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα YAE αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά κατά 70,2% ($p=0.003$) σε σχέση με το βάρος των προβάτων που λάμβαναν το κοινό σιτηρέσιο.

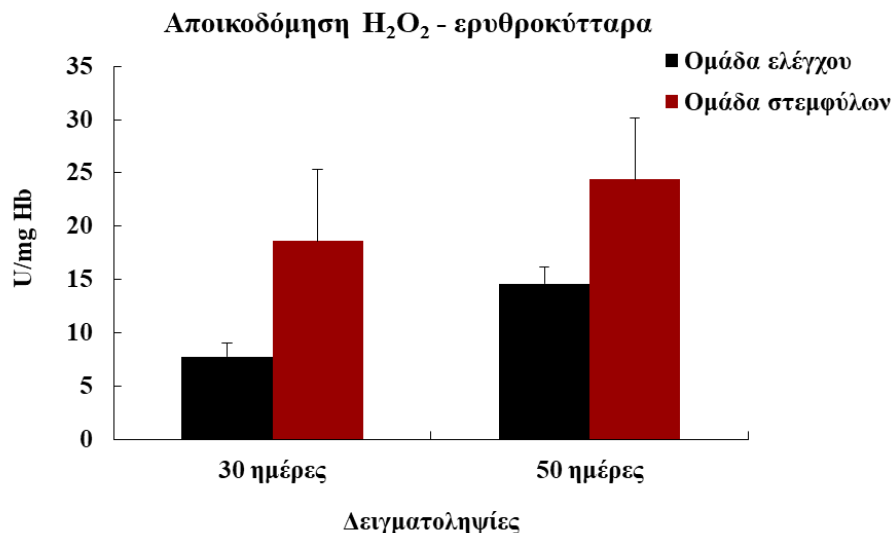
5.3. Οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αίμα και ιστούς των κοτόπουλων – Ζωοτροφή με στέμφυλα

5.3.1. Αποτελέσματα που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών στα κοτόπουλα

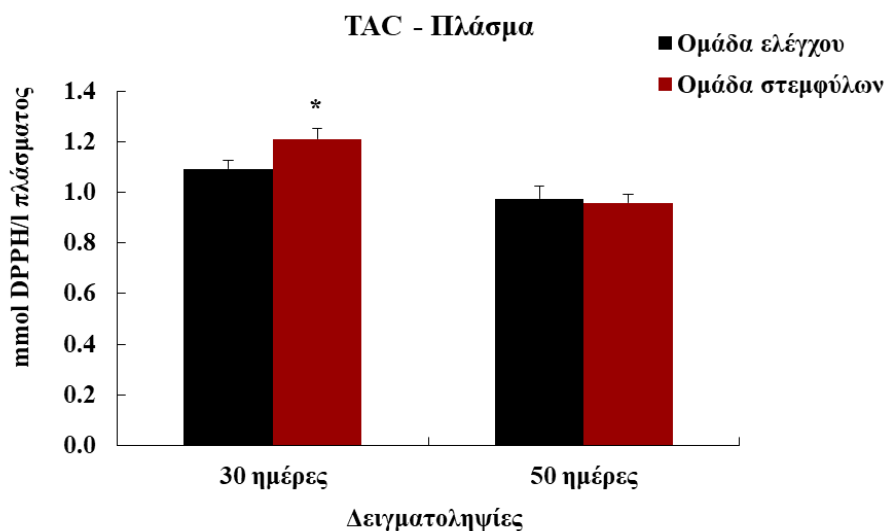
5.3.1.1. Αίμα



Διάγραμμα 13. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.



Διάγραμμα 14. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες).



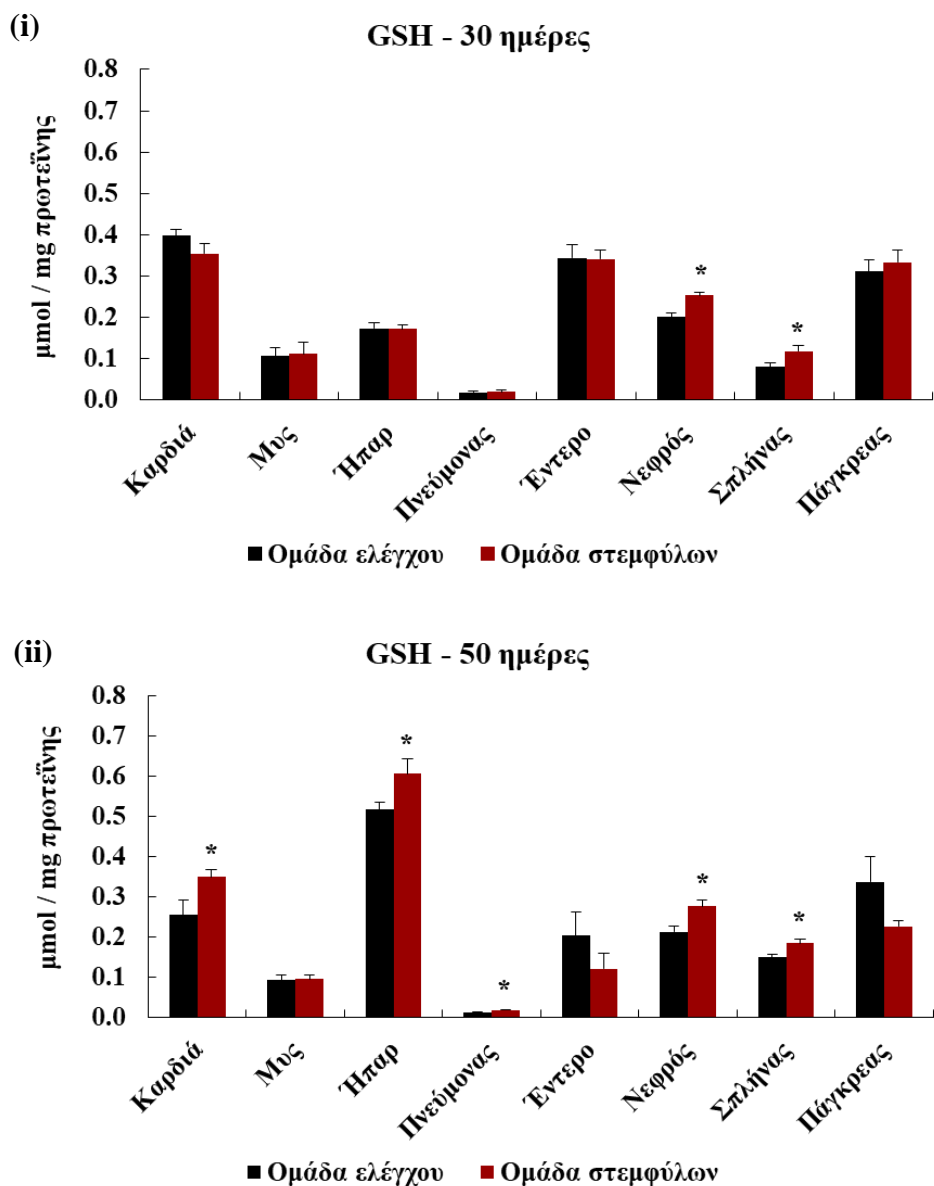
Διάγραμμα 15. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 13, 14 και 15 φαίνονται τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στο αίμα (πλάσμα και ερυθροκύτταρα) των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). Συγκεκριμένα στο Διάγραμμα 13 φαίνεται η επίδρασή τους στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης που μετράται στα ερυθροκύτταρα. Παρατηρείται ότι στις 50 ημέρες η συγκέντρωση της GSH αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά κατά 51,4% ($p < 0.05$) στην ομάδα των πουλερικών που λάμβανε τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποίησης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στην πρώτη δειγματοληψία (30 ημέρες) παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης ($p = 0.06$), στην ομάδα των στεμφύλων, χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική.

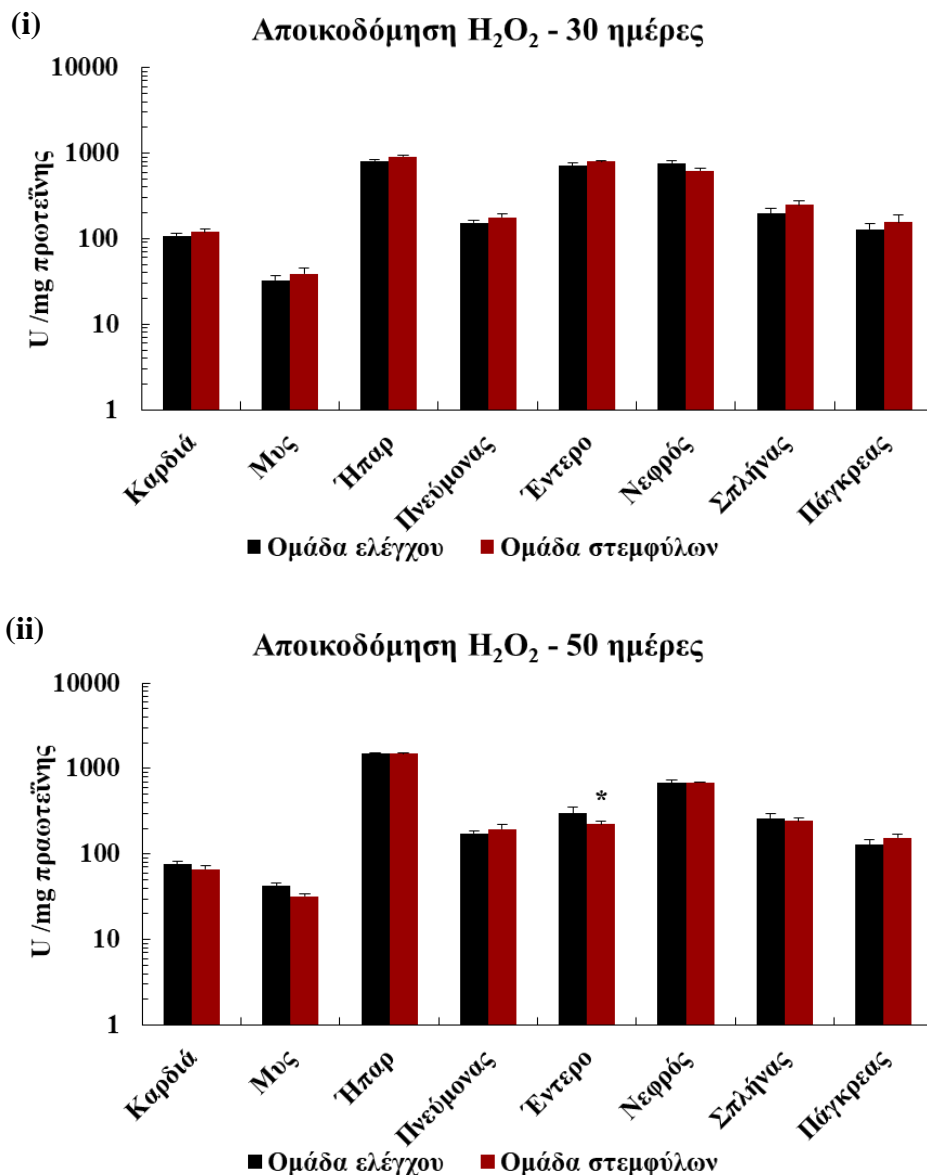
Στο Διάγραμμα 14 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με το ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), στην οποία συμμετέχει το ένζυμο της καταλάσης, και μετράται στα ερυθροκύτταρα. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ των δυο ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

Τέλος, το Διάγραμμα 15, δείχνει τα αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (TAC) στις δυο ομάδες πειραματισμού. Στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 10,7% ($p < 0.05$), παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες, στην ομάδα των πουλερικών που λάμβανε τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με το ενσίρωμα στεμφύλων, σε σχέση με την ομάδα που λάμβανε την κοινή ζωοτροφή. Καμία σημαντική μεταβολή δεν φάνηκε στις 50 ημέρες.

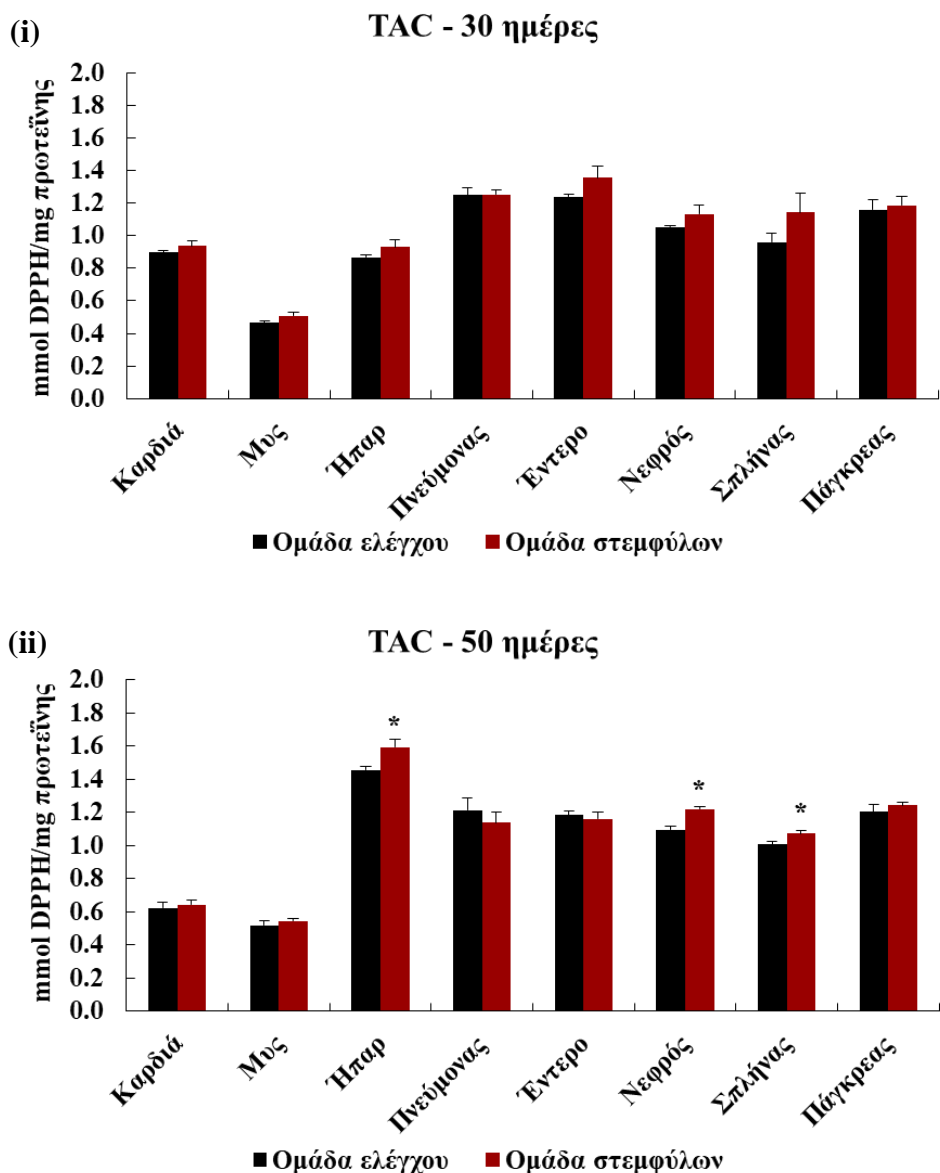
5.3.1.2. Ιστοί



Διάγραμμα 16. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.



Διάγραμμα 17. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 , στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.



Διάγραμμα 18. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 16, 17 και 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα δείγματα των 8 ιστών των κοτόπουλων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες από τη γέννηση). Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 16 φαίνονται τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, έπειτα από τη χορήγηση των

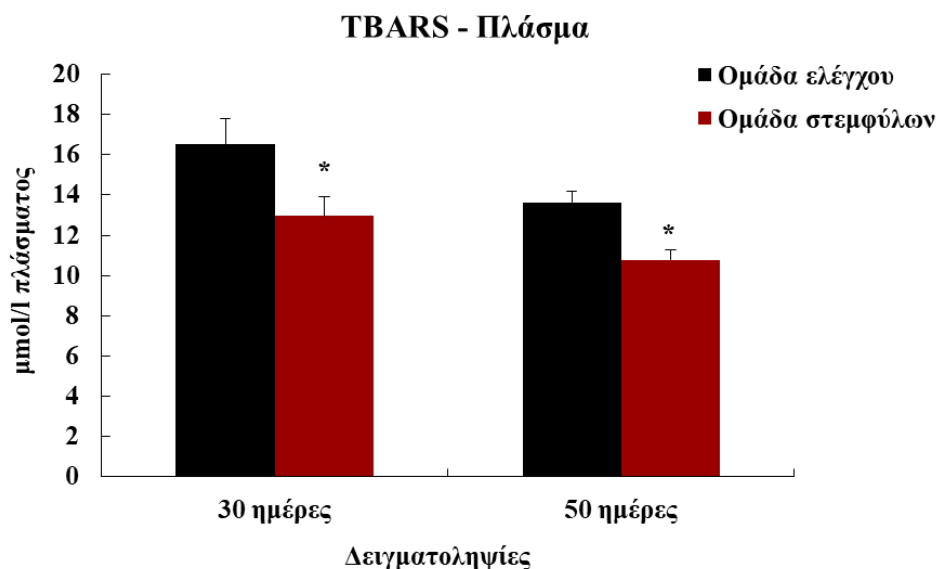
ζωοτροφών (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες μετά τη γέννηση των πουλερικών. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με τα υποπροϊόντα οινοποίησης οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH κατά 26 και 48.4% στον νεφρό και στο σπλήνα αντίστοιχα, κατά την πρώτη δειγματοληψία. Στις 50 ημέρες τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν σημαντικά κατά 37.2, 17.3, 38.1, 22.8 και 29.9%, στην καρδιά, στο ήπαρ, στον πνεύμονα, στο νεφρό και στο σπλήνα αντίστοιχα, στην ομάδα που λάμβανε τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Στο Διάγραμμα 17 απεικονίζεται η επίδραση των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην ικανότητα των ιστών των κοτόπουλων να ανάγουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες από τη γέννηση). Συγκεκριμένα, σε κανένα από τους ιστούς που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 σε καμία από τις δυο δειγματοληψίες, εκτός του ιστού του εντέρου, όπου στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 25.2% ($p < 0.05$) στην ομάδα των πουλερικών που λάμβαναν τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

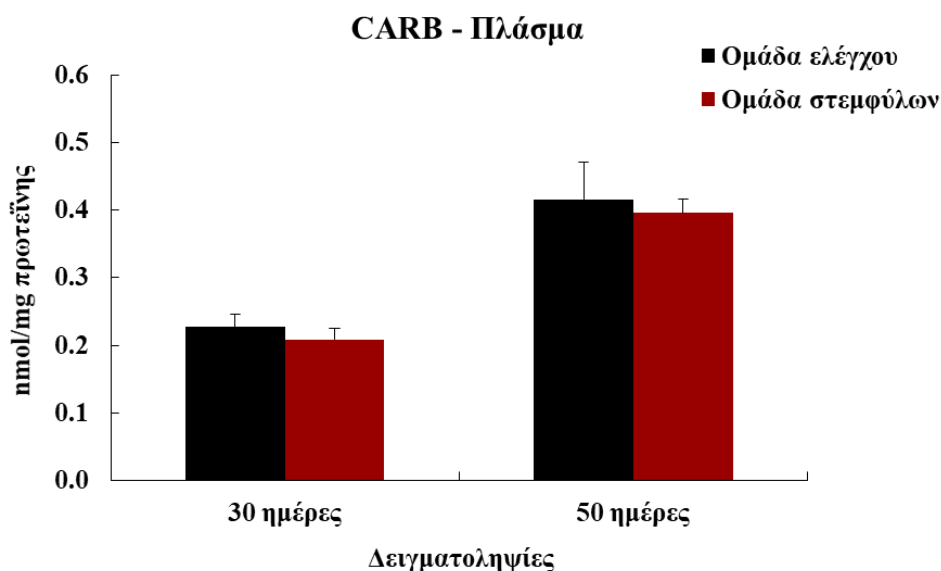
Στο Διάγραμμα 18 φαίνεται η επίδραση της χορήγησης των ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των μελετηθέντων ιστών των κοτόπουλων στις 30 και 50 ημέρες από τη γέννησή τους. Παρατηρήθηκε ότι η TAC αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά στις 50 ημέρες στο ήπαρ, στο νεφρό και στο σπλήνα κατά 9.5, 11.4 και 6.7% ($p < 0.05$) αντίστοιχα, στην ομάδα στεμφύλων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Κατά την πρώτη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε όταν τα κοτόπουλα ήταν 30 ημερών, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της TAC σε κανέναν ιστό.

5.3.2. Αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των ζωοτροφών σε οξειδωτικές βλάβες λιπιδίων και πρωτεϊνών

5.3.2.1. Αίμα



Διάγραμμα 19. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων (TBARS) στο πλάσμα των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες). *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

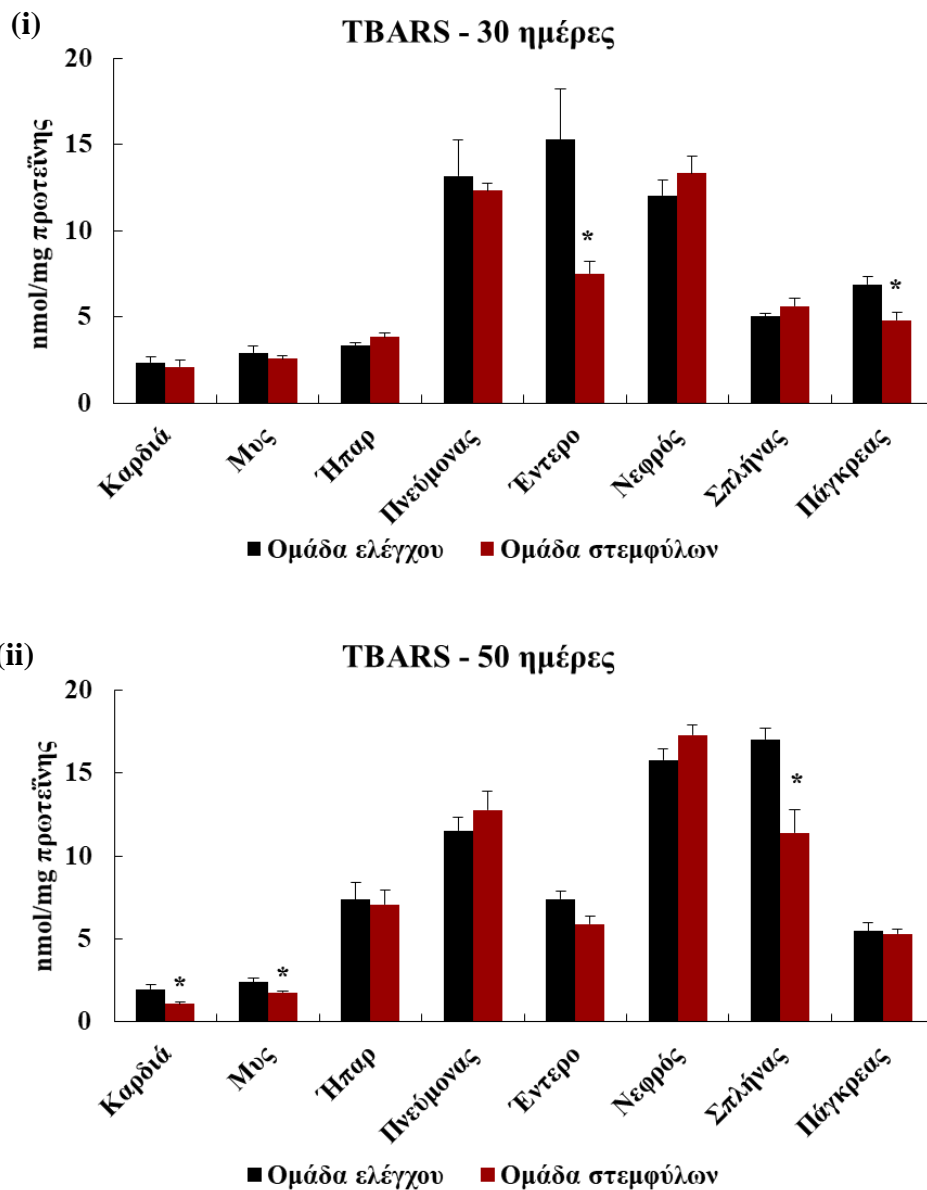


Διάγραμμα 20. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα υπεροξειδωσίας πρωτεϊνών (CARB) στο πλάσμα των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες).

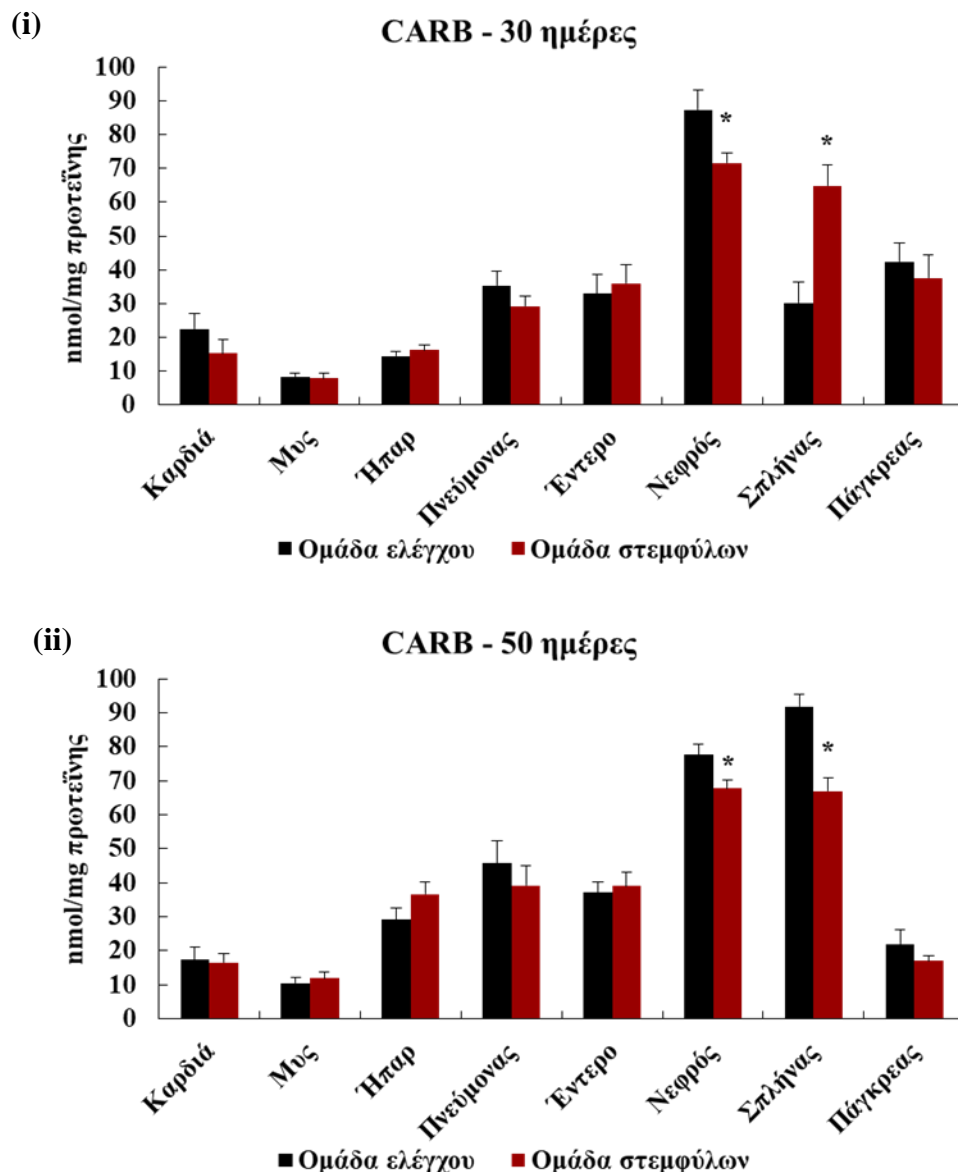
Στα διαγράμματα 19 και 20 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων (TBARS) και πρωτεϊνών (CARB) στα δείγματα πλάσματος των πουλερικών, που λήφθηκαν κατά τις 30 και 50 ημέρες από τη γέννησή τους. Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 19 φαίνονται τα μειωμένα επίπεδα των TBARS (δείκτης που αφορά την οξείδωση των λιπιδίων από τη δράση των ελευθέρων ριζών) και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Στις 30 ημέρες, τα TBARS μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά στο πλάσμα από την ομάδα των πουλερικών που λάμβανε τη ζωοτροφή με το ενσίρωμα στεμφύλων κατά 21.5% ($p < 0.05$) σε σχέση με τα κοτόπουλα της ομάδας ελέγχου που λάμβαναν το κοινό σιτηρέσιο. Στις 50 ημέρες τα επίπεδα των TBARS μειώθηκαν επίσης κατά 20.9% ($p < 0.01$) στην ομάδα των στεμφύλων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Στο Διάγραμμα 20 φαίνεται η επίδραση των δυο ζωοτροφών στο δείκτη που αφορά την υπεροξειδωση των πρωτεϊνών (πρωτεϊνικά καρβονύλια – CARB) στα δείγματα πλάσματος των πουλερικών στις δυο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν (30 και 50 ημέρες). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά καρβονύλια μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και στεμφύλων) σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

5.3.2.2. *Ιστοί*



Διάγραμμα 21. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα οξειδωσης λιπιδίων (TBARS) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικός σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.



Διάγραμμα 22. Επίδραση της χορήγησης των βιολεειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στα επίπεδα υπεροξειδωσις πρωτεϊνών (CARB) των ιστών των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 21 και 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων (TBARS) και των πρωτεϊνών (CARB) στους ιστούς των πουλερικών, κατά τις 30 και 50 ημέρες από τη γέννησή τους ύστερα από τη χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα) και κοινής ζωοτροφής. Πιο συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 21 παρατηρήθηκε

στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων των TBARS στο έντερο και στο πάγκρεας κατά 50.9 και 30.1% ($p < 0.05$) αντίστοιχα, στην ομάδα στεμφύλων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μέχρι τις 30 ημέρες του πειράματος. Στις 50 ημέρες, τα TBARS μειώθηκαν σημαντικά κατά 45.6, 25.7 και 33.2% ($p < 0.05$) στην καρδιά, στον τετρακέφαλο μυ και στο σπλήνα αντίστοιχα, στην ομάδα των κοτόπουλων που χορηγήθηκε η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Στο Διάγραμμα 22 (i) φαίνεται η επίδραση των δυο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων), στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξείδωσης, στους ιστούς των πουλερικών κατά την πρώτη δειγματοληψία (30 ημέρες). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι, στην ομάδα που κατανάλωσε τη ζωοτροφή με το ενσίρωμα στεμφύλων, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 18.0% ($p < 0.05$) στο νεφρό και αυξήθηκαν σημαντικά κατά 114.7% ($p < 0.05$) στο σπλήνα, σε σχέση με την ομάδα που κατανάλωσε το κοινό σιτηρέσιο. Στις 50 ημέρες (Διάγραμμα 22 (ii)), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώνονται στατιστικώς σημαντικά κατά 12.6 και 27.2% ($p < 0.05$) στο νεφρό και στο σπλήνα αντίστοιχα, στην ομάδα των στεμφύλων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεντρωτικά, όλα τα αποτελέσματα των βιοδεικτών στο αίμα και ιστούς των κοτόπουλων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Σύνοψη αποτελεσμάτων επίδρασης της ζωοτροφής με στέμφυλα στους βιοδείκτες των πουλερικών κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (30 και 50 ημέρες)

Αίμα-Ιστοί Βιοδείκτες	ΑΙΜΑ		ΚΑΡΔΙΑ		ΜΥΣ		ΗΠΑΡ		ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ		ΕΝΤΕΡΟ		ΝΕΦΡΟΣ		ΣΠΛΗΝΑΣ		ΠΑΓΚΡΕΑΣ	
	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50
GSH	↔	↑	↔	↑	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↔	↔
Αποικοδόμηση H₂O₂	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↔	↔
TAC	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔
TBARS	↓	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↔
CARB	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↑	↓	↔	↔

Τα βέλη με φορά προς τα πάνω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική αύξηση. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική μείωση. Τα αμφίδρομα βέλη υποδηλώνουν πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των δυο ομάδων την ίδια χρονική στιγμή. Η γαλάζια σκίαση αφορά μεταβολές στους δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η κόκκινη σκίαση αφορά μεταβολές στους δείκτες οξειδωτικής καταστροφής.

5.3.3. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις *in vitro* τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης-στέμφυλα, και της κοινής ζωοτροφής, μέσω των μεθόδων εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (DPPH και ABTS), έδειξαν ότι η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα είχε περίπου δύο φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από το κοινό σιτηρέσιο. Η παρατηρούμενη ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της ζωοτροφής με τα στέμφυλα, βασίζεται πιθανώς στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες όπως η κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, ταννίνες, κουμαρικό και γαλλικό οξύ, ρεσβερατρόλη (173–175). Αυτό επιβεβαιώνεται και από προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, όπου ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα που χορηγήθηκε σε χοίρους, είχε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία συνοδεύεται από ταυτόχρονη αύξηση του συνολικού πολυφαινολικού της περιεχομένου (176). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι τα στέμφυλα είναι φυτικής προελεύσεως ιδιαίτερα πλούσια σε διάφορες πολυφαινόλες που δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες και τερματίζοντας οξειδωτικές αντιδράσεις (176–179).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του βάρους των κοτόπουλων ανάμεσα στις δυο ομάδες καθ' όλη τη διάρκεια της χορήγησης των δυο ζωοτροφών έδειξαν ότι η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα στέμφυλα δεν επηρέασε σημαντικά το βάρος των κοτόπουλων σε σχέση με αυτά που έλαβαν το κοινό σιτηρέσιο. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική μας ομάδα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο βάρος των κοτόπουλων όταν στη διατροφή τους προστέθηκαν απόβλητα ελαιολιπιδίου, πλούσια επίσης σε πολυφαινόλες (146). Αντίθετα, μελέτες σε χοίρους και νεαρά κοτόπουλα όπου στη διατροφή τους προστέθηκαν στέμφυλα, το βάρος τους αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τα ζώα που έλαβαν κοινές ζωοτροφές (180,181). Επιπλέον, σε παρόμοια μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, το βάρος προβάτων που έλαβαν ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με το βάρος των προβάτων που έλαβαν κοινή ζωοτροφή (151).



Στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου αναλύθηκαν τα αποτελέσματα σε δείγματα αίματος και 8 ιστών, από τα κοτόπουλα στα οποία χορηγήθηκε η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποίησης-στεμφυλα. Όπως παρουσιάστηκε από την *in vitro* μελέτη των δυο πειραματικών ζωοτροφών που παρασκευάστηκαν για χάριν της παρούσας διατριβής, η ζωοτροφή που αποτέλεσε την ομάδα των στεμφύλων έδειξε διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την κοινή ζωοτροφή. Σκοπός λοιπόν αυτού του μέρους ήταν να διερευνηθεί η πιθανότητα τα αποτελέσματα από τις *in vitro* τεχνικές, να συνάδουν με αυτά της *in vivo* χορήγησης σε επίπεδο παραγωγικών, πια, ζώων, αφού εκεί μεσολαβούν παράγοντες όπως η απορρόφηση, κατανομή και μεταβολισμός ξеноβιοτικών ουσιών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την κατηγορία των πολυφαινολών, αφού αυτές οι ουσίες παρουσιάζουν χαμηλή απορροφητικότητα μέσα στους οργανισμούς (59).

Οι δυο ζωοτροφές χορηγήθηκαν σε 30 κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, ηλικίας 2 ημερών και συνολικά για 50 ημέρες. Τις πρώτες 15 ημέρες όλα τα πουλερικά κατανάλωσαν την κοινή ζωοτροφή, ενώ για τις επόμενες 35 ημέρες η κάθε ομάδα λάμβανε και την αντίστοιχη ζωοτροφή (ελέγχου και στεμφύλων). Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες σε δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές (30 και 50 ημέρες) για τους εξής λόγους: η πρώτη δειγματοληψία στις 30 ημέρες πραγματοποιήθηκε γιατί τα κοτόπουλα βρίσκονται σε πολύ μικρή ηλικία και οι αμυντικοί τους μηχανισμοί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θεωρούνται ιδιαίτερος ασθενείς (182,183). Είναι δηλαδή πιο ευάλωτα σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (96). Η δεύτερη δειγματοληψία στις 50 ημέρες επιλέχθηκε επειδή σε αυτή την ηλικία συνήθως τα κοτόπουλα θυσιάζονται προκειμένου να βγει το κρέας τους στην κατανάλωση (34). Κατά τις δυο αυτές χρονικές στιγμές έγινε λήψη αίματος και 8 ιστών (καρδιά, ήπαρ, τετρακέφαλος μυς, πνεύμονας, σπλήνας, νεφρό, έντερο και πάγκρεας) από κάθε ζώο της κάθε ομάδας, προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες μετρήσεις.

5.3.3.1. Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις βιοδεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα (γλουταθειόνη, ρυθμός αποικοδόμησης H₂O₂, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα), η χορήγηση της πολυφαινολικής ζωοτροφής

εμπλουτισμένης με στέμφυλα, αύξησε σημαντικά τα επίπεδά τους, τόσο στο αίμα όσο και στους διάφορους ιστούς.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης, εκείνη αυξήθηκε σημαντικά στον ιστό του νεφρού και του σπλήνα στις 30 ημέρες, ενώ στις 50 ημέρες μετά τη γέννηση των πουλερικών, αυτά τα επίπεδα αυξήθηκαν σημαντικά τόσο στα ερυθροκύτταρα, όσο και στους ιστούς της καρδιάς, του ήπατος, των πνευμόνων, των νεφρών και του σπλήνα, σε ποσοστά από 23-21.4%, στην πολυφαινολική ομάδα (ομάδα στεμφύλων) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σε παρόμοια μελέτη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας, η χορήγηση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με πολυφαινόλες προερχόμενες από λύματα που παράγονται κατά την επεξεργασία του ελαιολάδου σε κοτόπουλα (146) και χοιρίδια (150) κρεοπαραγωγής, οδήγησε σε αύξηση της GSH τόσο στα ερυθροκύτταρα όσο και σε ιστούς όπως πάγκρεας, στομάχι, καρδιά, ήπαρ, τετρακέφαλος μυς, πνεύμονας, σπλήνα, νεφρό κλπ. Η γλουταθειόνη αποτελεί το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο του οργανισμού, αφού είναι η πιο άφθονη, μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στα κύτταρα, προστατεύοντας τα από το οξειδωτικό στρες (34,184).

Τα αυξημένα επίπεδα της GSH μπορούν να οφείλονται είτε σε αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό ρυθμό της, είτε σε αύξηση εκείνων που συμμετέχουν στο ρυθμό ανακύκλωσής της. Οι θετικές λοιπόν επιδράσεις της εμπλουτισμένης με στέμφυλα ζωοτροφής μπορούν να εξηγηθούν πιθανόν μέσω ενζύμων που συμμετέχουν στις παραπάνω διαδικασίες, όπως τα ένζυμα σύνθεσης (λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης- γ-GCL, συνθετάση της γλουταθειόνης-GS), ή τα ένζυμα ανακύκλωσής της (αναγωγάση-GR και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-GPx) (184). Σε προηγούμενες εργαστηριακές μελέτες έχει φανεί ότι πολυφαινολικά εκχυλίσματα από στέμφυλα κόκκινου κρασιού αύξησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα μυϊκών και ενδοθυλιακών κυττάρων μέσω αύξησης των επιπέδων της GSH, της έκφρασης της γ-GCL και της δραστηριότητας της GST (177,178,185). Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των ενζύμων προκαλείται κυρίως μέσω αντιοξειδωτικών στοιχείων απόκρισης (antioxidant response elements-AREs), που είναι μια αλληλουχία cis-ενισχυτών ρυθμίζοντας τη μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (186). Επιπλέον, στη «θεωρία της οξειδοαναγωγής» μόρια όπως η γλουταθειόνη που περιέχει θειολικές ομάδες,

θεωρούνται κρίσιμα στοιχεία στη βιολογία οξειδοαναγωγικών συστημάτων (187,188). Συγκεκριμένα, όλα τα βιολογικά συστήματα περιέχουν στοιχεία που αναφέρθηκαν πιο πάνω (AREs), τα οποία συμμετέχουν σε κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, και συντονίζονται μέσω κυκλωμάτων οξειδοαναγωγής που εξαρτώνται από κρίσιμα μόρια όπως η GSH (188). Έτσι, το οξειδωτικό στρες συμβαίνει όταν διακόπτεται η λειτουργία αυτών των συστημάτων οξειδοαναγωγής. Σύμφωνα λοιπόν με τη «θεωρία της οξειδοαναγωγής», η αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης στις διεργασίες οξειδοαναγωγής (187,188).

Ο δεύτερος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η ικανότητα και ο ρυθμός των ερυθροκυττάρων και των ιστών, αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Η μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 στα ερυθροκύτταρα αποδίδεται συνήθως στη δραστικότητα ενός ενζύμου, της καταλάσης (189,190). Από την άλλη, στους ιστούς η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο δεν οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στο ένζυμο της καταλάσης, αλλά και στη συμμετοχή άλλων ενζύμων όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η οποία συμμετέχει στη μετατροπή της GSH σε GSSG, και οι περοξειρεδοξίνες (Prx) (191). Έτσι, δεν μπορούμε να εκφράσουμε τα αποτελέσματα με βάση τη δραστικότητα ενός μόνο ενζύμου και για αυτό γίνεται λόγος για το ρυθμό αποικοδόμησης H_2O_2 συμπεριλαμβάνοντας όλα τα ένζυμα που μπορεί να συμμετέχουν στη διαδικασία. Όσον αφορά τα ερυθροκύτταρα, ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ της ομάδας των στεμφύλων και της ομάδας ελέγχου, σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και σε επίπεδο ιστών, με μόνη εξαίρεση τη σημαντική μείωση στον ιστό του εντέρου στη δεύτερη δειγματοληψία (50 ημέρες) στην ομάδα που έλαβε τη ζωοτροφή με τα στέμφυλα. Τα παραπάνω συμπίπτουν με μελέτες όπου έχει χορηγηθεί πολυφαινολικό εκχύλισμα στεμφύλων τόσο σε μυϊκά κύτταρα, όπου παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης, όσο και σε ενδοθηλιακά όπου το εκχύλισμα δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα (177,178). Το γεγονός λοιπόν ότι οι πολυφαινόλες των στεμφύλων δεν είχαν καμία ή ακόμη και μείωσαν το ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 , μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν και να ενισχύουν άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα ένζυμα που σχετίζονται με την ανακύκλωση της γλουταθειόνης (π.χ. GPx) (34,166). Ωστόσο, σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι

η χορήγηση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από την επεξεργασία τόσο της ελιάς, όσο και του σταφυλιού σε χοιρίδια και αρουραίους προκάλεσε αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης του H_2O_2 τόσο στα ερυθροκύτταρα, όσο και σε διάφορους ιστούς (πάγκρεας, τετρακέφαλο μυ, νεφρό) (150,151,192). Επομένως, φαίνεται και από τη βιβλιογραφία ότι διαφορετικές πολυφαινόλες επηρεάζουν διαφορετικά το ρυθμό διάσπαση του υπεροξειδίου, αφού είναι πιθανόν να δρουν διαφορετικά στη δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή (34).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), η χορήγηση της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδά της στο πλάσμα κατά την 1^η δειγματοληψία, καθώς και στους ιστούς του σπλήνα, του ήπατος και του νεφρού στις 50 ημέρες μετά τη γέννηση των πουλερικών. Όπως παρατηρείται και από τον πίνακα 16 (Πίνακας 16), τα αυξημένα επίπεδα της TAC στο πλάσμα, στις 30 ημέρες, έρχονται σε συμφωνία με τα σημαντικώς μειωμένα επίπεδα των TBARS που θα αναλυθούν παρακάτω. Όσον αφορά τα αποτελέσματα στους ιστούς, παρατηρήθηκε μια ιστο-ειδικότητα σε αυτά. Συγκεκριμένα, στο νεφρό η αύξηση της TAC μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην αντίστοιχη αύξηση της GSH στο συγκεκριμένο ιστό, και στα μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που παρατηρήθηκαν στη 2^η δειγματοληψία. Ομοίως, κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στον ιστό του σπλήνα, όπου και εκεί παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της GSH στην πολυφαινολική ομάδα και αυτή η αύξηση της TAC πιθανόν να δικαιολογεί και τα μειωμένα επίπεδα TBARS και CARB που θα αναλυθούν στη συνέχεια. Στον ιστό του ήπατος η αύξηση των επιπέδων της TAC συνοδεύτηκε από την παράλληλη αύξηση της γλουταθειόνης, όπως σχολιάστηκε προηγουμένως.

Η απουσία σημαντικών μεταβολών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ορισμένους ιστούς της ομάδας των στεμφύλων (π.χ. στην καρδιά και στον πνεύμονα, στις 50 ημέρες μετά τη γέννηση των κοτόπουλων), που παρ' όλα αυτά είχαν αύξηση των επιπέδων αντιοξειδωτικών μορίων (GSH), μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όταν σε έναν ζωντανό οργανισμό παρατηρείται αύξηση ορισμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών, κάποιιοι άλλοι να μην μεταβάλλονται χάριν κυτταρικής οικονομίας (34). Βέβαια στη βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης ότι, ζωοτροφές εμπλουτισμένες με στέμφυλα που χορηγήθηκαν σε κοτόπουλα αύξησαν αποτελεσματικά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα

χωρίς να επηρεαστεί αρνητικά η ανάπτυξή τους, τα πεπτικά τους όργανα και την απορρόφηση-αφομοίωση των πρωτεϊνών (193). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η διατροφή των κοτόπουλων με ζωοτροφή που περιείχε στέμφυλα έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην τροποποίηση της μορφολογίας του εντέρου και της εντερικής μικροχλωρίδας και αυξάνει το βαθμό βιοποικιλότητας των εντερικών βακτηριδίων (194).

5.3.3.2. Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις βιοδεικτών που σχετίζονται με τις βλάβες που προκαλούνται σε λιπίδια και πρωτεΐνες εξ' αιτίας του οξειδωτικού στρες (TBARS, CARB) η χορήγηση της πολυφαινολικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα, μείωσε σημαντικά τα επίπεδά τους, τόσο στο αίμα όσο και στους διάφορους ιστούς.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των TBARS (δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων) στο πλάσμα έδειξαν ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων μειώθηκε σημαντικά τόσο στις 30 όσο και στις 50 ημέρες μετά τη γέννηση των κοτόπουλων στην ομάδα που έλαβε τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα στεμφύλων σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε το κοινό σιτηρέσιο. Η παρατηρούμενη μείωση των TBARS στο πλάσμα στις 50 ημέρες μπορεί να αποδοθεί στην αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, όπως φάνηκε και από τη συσχέτιση των δεικτών (Πίνακας 16), όπου η GSH με τα TBARS είχαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Σε επίπεδο ιστών, η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με στέμφυλα μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στο έντερο και στο πάγκρεας κατά την 1^η δειγματοληψία (30 ημέρες) και στην καρδιά, στο σπλήνα και στον τετρακέφαλο μυ στη 2^η δειγματοληψία (50 ημέρες). Στο πλάσμα, στην καρδιά και στο σπλήνα τα μειωμένα TBARS ακολουθούνται από παράλληλη αύξηση των επιπέδων της GSH και της TAC (πλάσμα και σπλήνα) (Πίνακας 16), οπότε παρατηρήθηκε ότι σε αυτούς τους ιστούς η επίδραση των στεμφύλων προστάτεψε από οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων, αυξάνοντας τη γλουταθειόνη και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, και μειώνοντας τα επίπεδα των TBARS. Οι Sayago-Ayerdi και συνεργάτες, στη μελέτη τους αναφέρουν ότι το κρέας των κοτόπουλων που είχαν τραφεί με ζωοτροφή που περιείχε στέμφυλα εμφάνισε μειωμένη

υπεροξειδωση λιπιδίων μετά από μακροχρόνια κατάψυξη σε σύγκριση με το κρέας εκείνων που τράφηκαν με το κοινό σιτηρέσιο (195). Παρομοίως, οι Gopi και συνεργάτες ανέφεραν ότι η σίτιση κοτόπουλων με στέμφυλα μειώνει την υπεροξειδωση λιπιδίων στο μαστό και στο κρέας του μηρού κατά την αποθήκευσή τους σε κατάψυξη (35).

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, φάνηκε ότι τροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς για παραγωγή ελαιολάδου, οδήγησε στη μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων τόσο στο αίμα όσο και στους ιστούς κοτόπουλων και χοιριδίων (146,150). Η μείωση των επιπέδων TBARS, εκτός από τη θετική επίδραση στην υγεία των ζώων, αφού προστατεύει από ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες, μπορεί επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος (34,96). Το εύρημα σχετικά με την μειωμένη υπεροξειδωση λιπιδίων που παρατηρήθηκε στον τετρακέφαλο μυ είναι ιδιαίτερος σημαντικό, καθώς η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας, της γεύσης και της θρεπτικής του αξίας (196,197). Επιπλέον, και σε άλλες μελέτες, έχει γίνει χρήση των πολυφαινολών στη διατροφή ως αντιοξειδωτικά για τη μείωση της υπεροξειδωσης λιπιδίων (198).

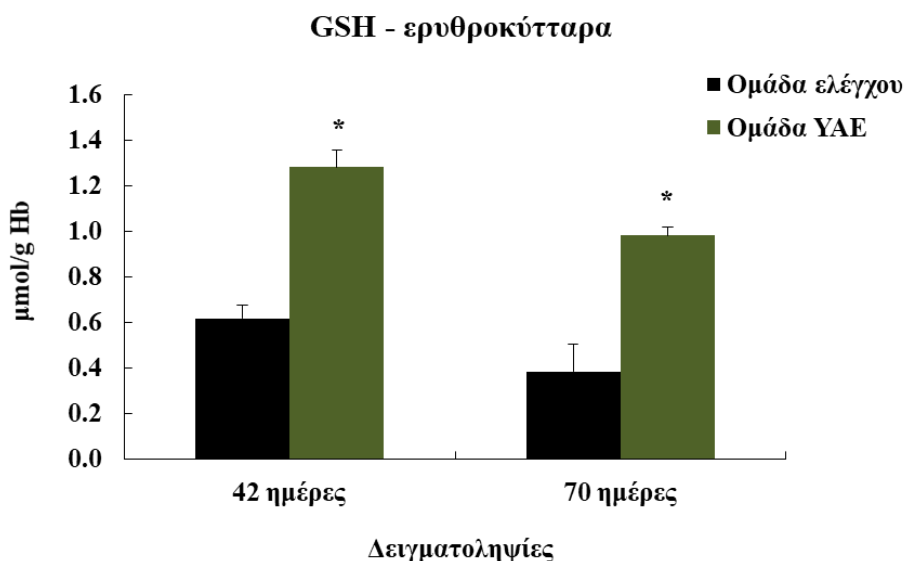
Τέλος, η αξιολόγηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έδειξε ότι η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης μείωσε σημαντικά την πρωτεϊνική οξείδωση μόνο στο νεφρό και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (30 και 50 ημέρες από τη γέννηση των κοτόπουλων), ενώ στο πλάσμα και στους υπόλοιπους ιστούς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές. Εξάιρεση αποτελεί ο ιστός του σπλήνα όπου ενώ στις 30 ημέρες τα CARB αυξάνονται σημαντικά, στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική πτώση των επιπέδων τους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο νεαρό της ηλικίας των κοτόπουλων, όπου η παρατηρούμενη αύξηση της γλουταθειόνης στις 30 ημέρες δεν ήταν επαρκής για να προστατέψει από την πρωτεϊνική οξείδωση, και πιθανόν οι μηχανισμοί άμυνας των κοτόπουλων σε μικρή ηλικία να μην είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένοι (34). Από την άλλη, η σημαντική μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων στα νεφρά και τον σπλήνα στις 50 ημέρες μπορεί εύκολα να συνδυαστεί και να αποδοθεί στην παρατηρούμενη αύξηση της GSH στις ίδιες χρονικές στιγμές (Πίνακας 16). Σε μελέτη του εργαστηρίου μας, όπου χορηγήθηκε ζωοτροφή με στέμφυλα σε χοιρίδια, παρατηρήθηκε ομοίως ιστο-ειδικότητα των αποτελεσμάτων των CARB, αφού αυτά μειώθηκαν σε

συγκεκριμένους ιστούς (π.χ. ήπαρ, τετρακέφαλο μυ, σπλήνα, πνεύμονα, πάγκρεας), ενώ και σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στο πλάσμα των χοιριδίων (151). Επιπλέον, σε άλλες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχει φανεί ότι ζωοτροφή που χορηγήθηκε σε κοτόπουλα, αλλά και χοιρίδια και ήταν εμπλουτισμένη με ΥΑΕ, μείωσε την πρωτεϊνική οξείδωση στο αίμα και στους ιστούς τους (146,150). Οι Stadtman και συνεργάτες σε μελέτη τους έχουν προτείνει ότι ένας κύριος παράγοντας που οδηγεί στην οξείδωση των αμινοξέων των πρωτεϊνών είναι η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}), που προέρχεται από τη διάσπαση του H_2O_2 , μέσω των αντιδράσεων Fenton (199). Έτσι, η αύξηση της γλουταθειόνης ή οι ίδιες οι πολυφαινόλες των στεμφύλων μπορούν να αναστείλουν αυτές τις αντιδράσεις προστατεύοντας τις πρωτεΐνες από την οξείδωσή τους. Αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό, αφού η οξείδωση μπορεί να προκαλέσει πολυμερισμό και συσσωμάτωση πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις καθιστά μη λειτουργικές και κατά συνέπεια να παρεμποδίζονται κυτταρικές δραστηριότητες (200).

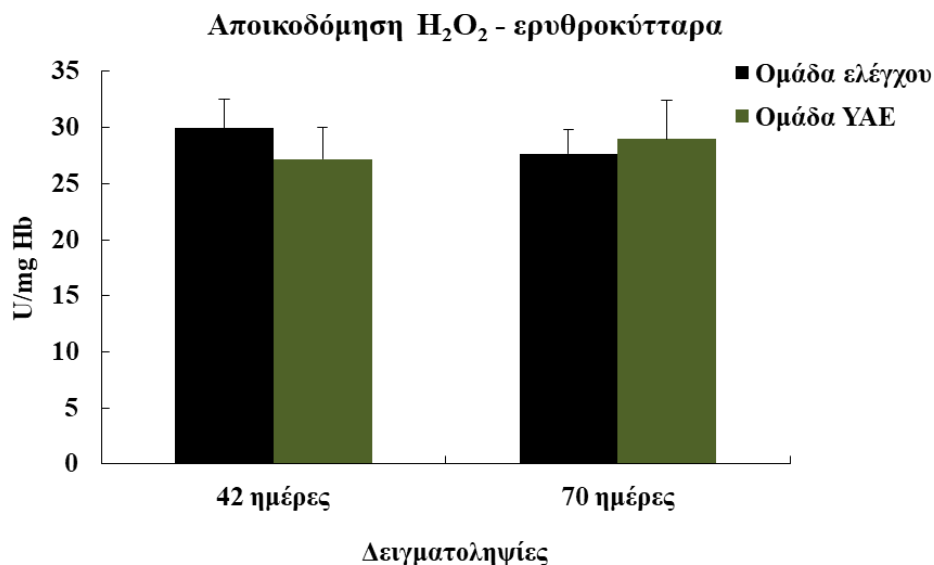
5.4. Οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αίμα και ιστούς των προβάτων – Ζωοτροφή με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

5.4.1. Αποτελέσματα που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ζωοτροφών στα πρόβατα

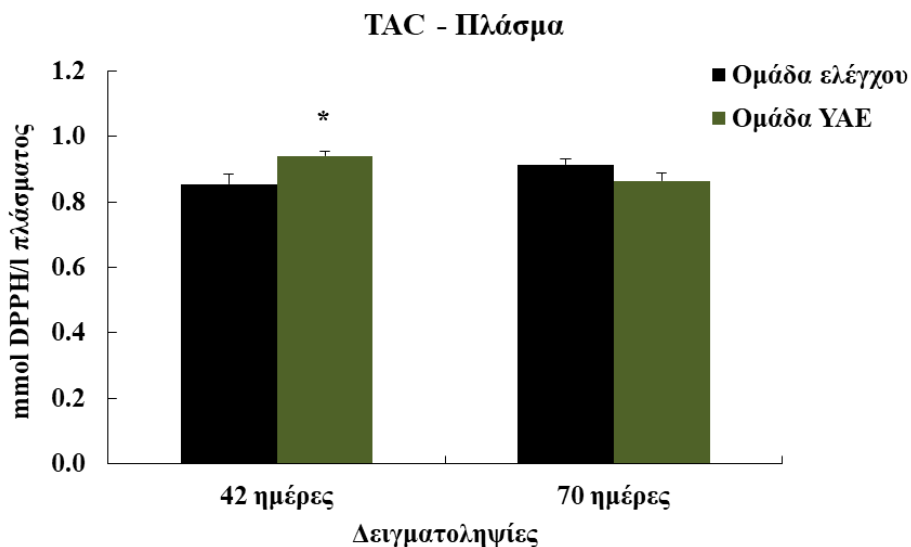
5.4.1.1. Αίμα



Διάγραμμα 23. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.



Διάγραμμα 25. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες).



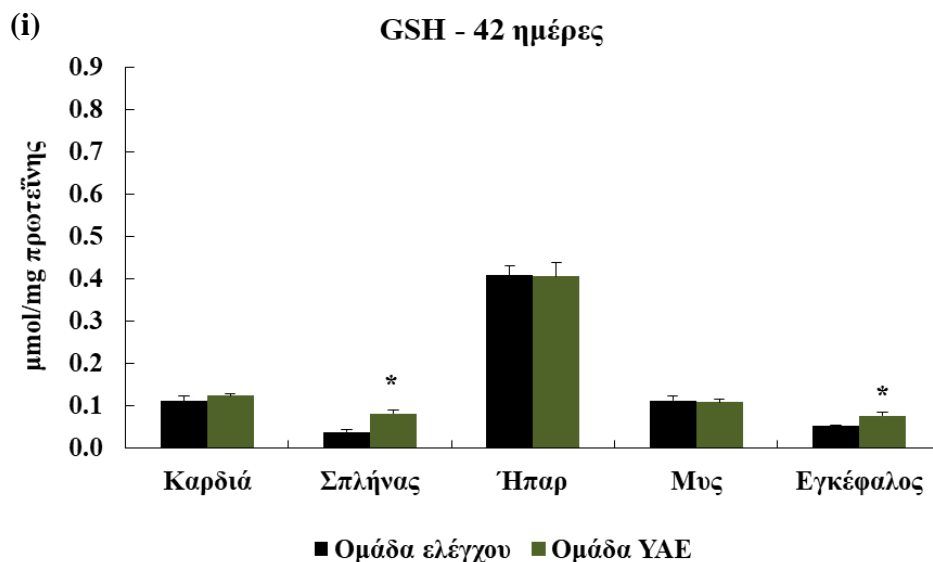
Διάγραμμα 24. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος των προβάτων, κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και YAE, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

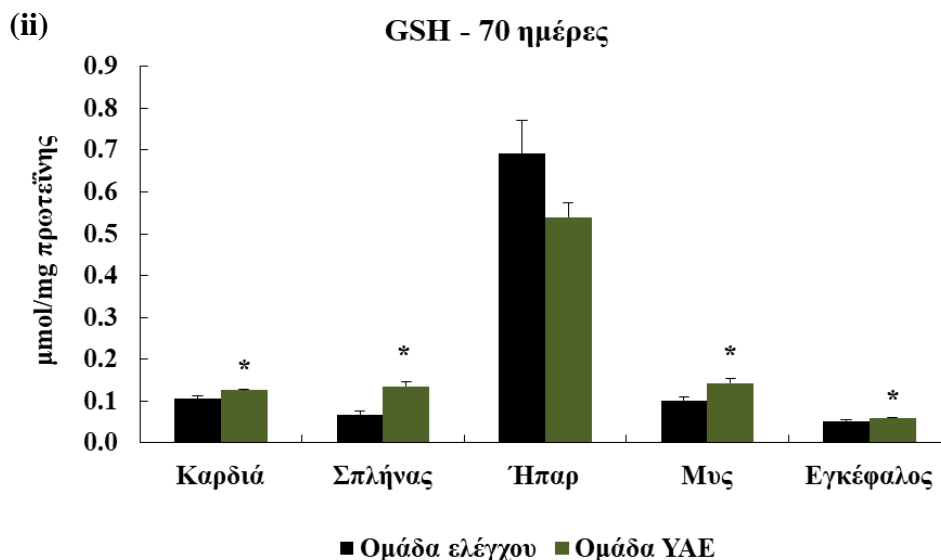
Στα διαγράμματα 23, 24 και 25 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στο πλάσμα (TAC) και στα ερυθροκύτταρα (GSH και αποικοδόμηση H_2O_2) των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες από τη γέννηση των αμνών). Συγκεκριμένα, όσο αναφορά τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα (Διάγραμμα 23), στην ομάδα των προβάτων που λάμβανε τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα απόβλητα ελαιοτριβείου, αυξήθηκαν κατά 106.9 και 155.9%, στις 42 και 70 ημέρες αντίστοιχα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Όσον αφορά το ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Διάγραμμα 25), αυτός δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε καμία από τις δυο δειγματοληψίες στα ερυθροκύτταρα μεταξύ των δύο ομάδων χορήγησης των ζωοτροφών.

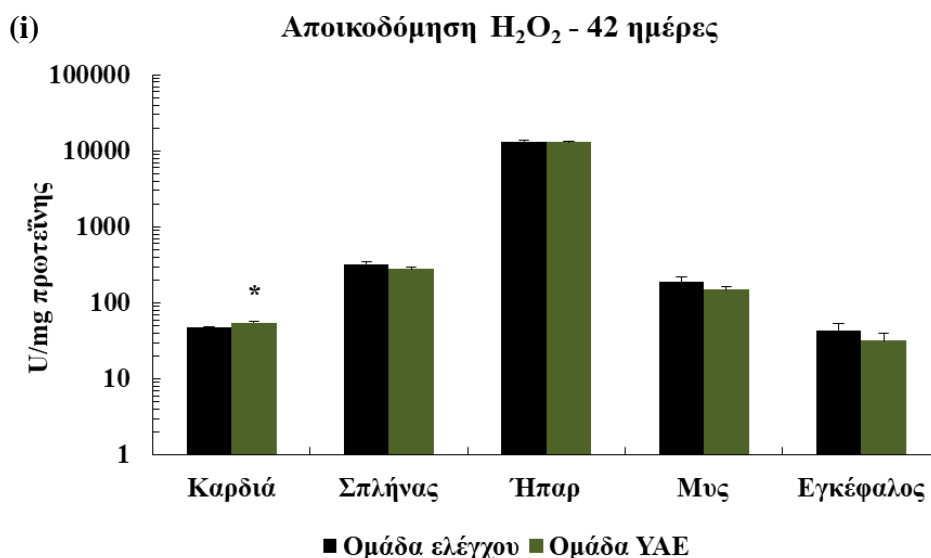
Στο Διάγραμμα 24 φαίνεται η επίδραση των δυο ζωοτροφών στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος των προβάτων στις 42 και 70 ημέρες από τη γέννησή τους. Συγκεκριμένα, η TAC ήταν σημαντικά αυξημένη κατά 10.1% στις 42 ημέρες, στην ομάδα που λάμβανε τη ζωοτροφή με το ενσίρωμα ΥΑΕ σε σύγκριση με την ομάδα που λάμβανε το κοινό σιτηρέσιο.

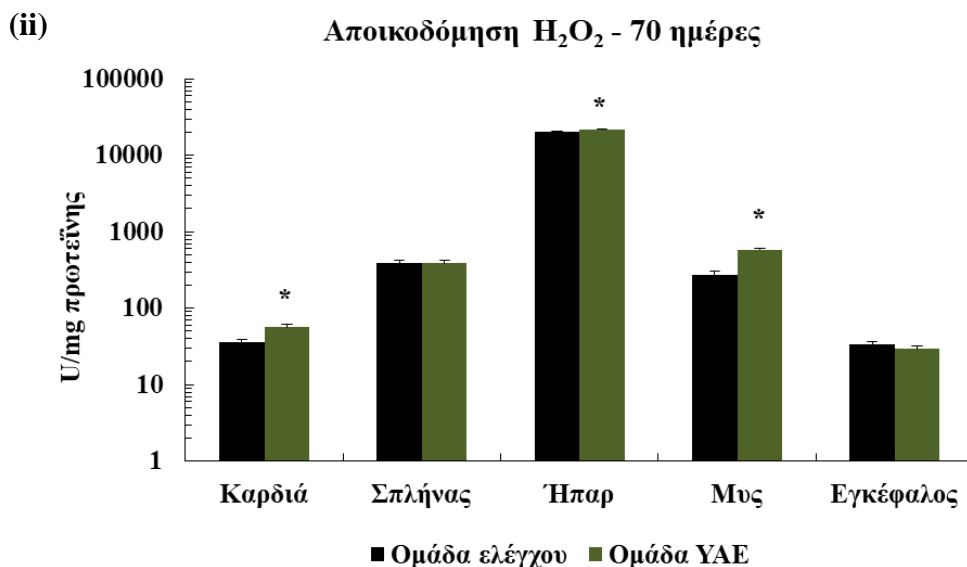
5.4.1.2. Ιστοί



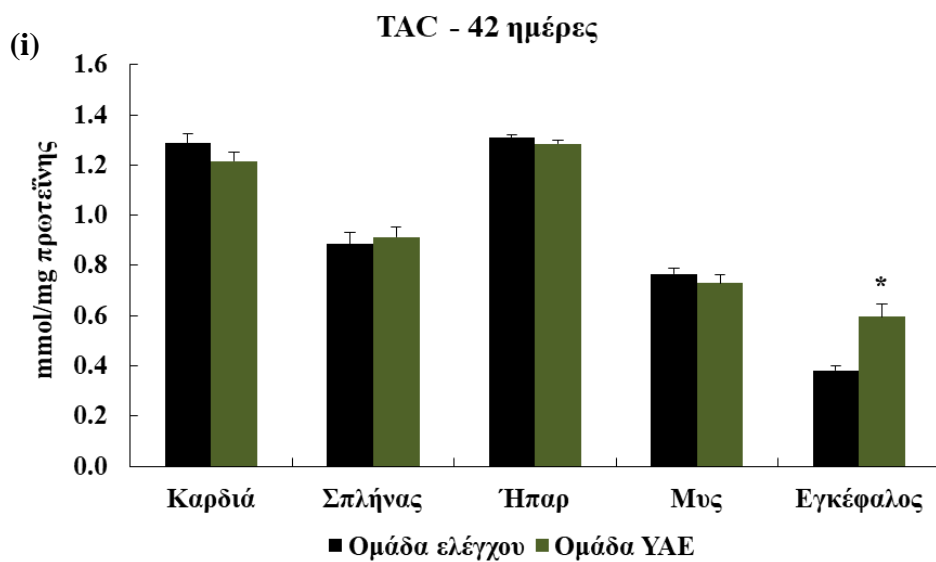


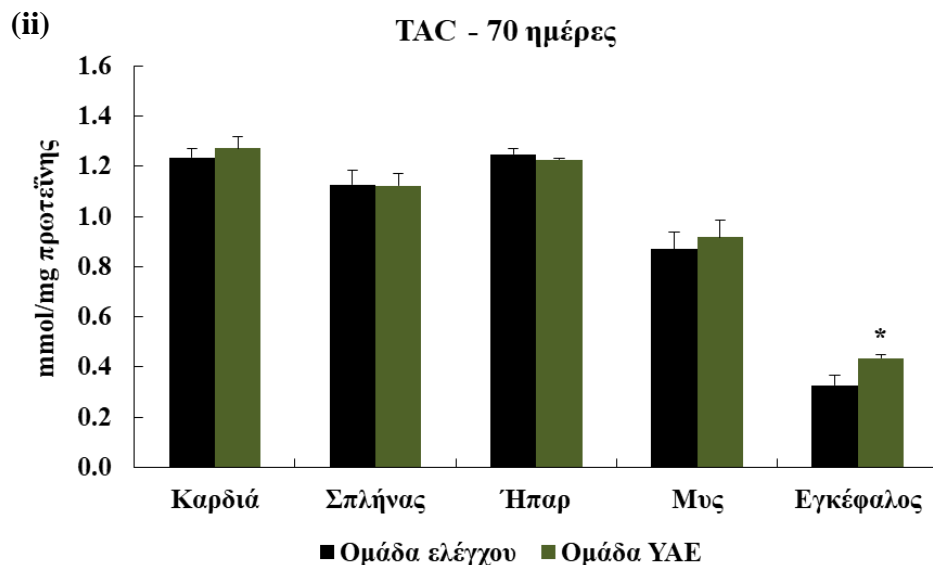
Διάγραμμα 26. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.





Διάγραμμα 27. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στο ρυθμό αποικοδόμησης του H₂O₂ στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας p < 0.05.





Διάγραμμα 28. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και YAE, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 26, 27 και 28 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στους ιστούς των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Αρχικά, όσον αφορά τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (Διάγραμμα 26), παρατηρήθηκε σημαντική τους αύξηση στις 42 ημέρες, κατά 110.0 και 36.9% στο σπλήνα και στον εγκέφαλο αντίστοιχα στην ομάδα YAE σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στις 70 ημέρες από τη γέννηση των αμνών, η GSH αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στους ιστούς της καρδιάς, του σπλήνα, του τετρακέφαλου μυ και του εγκεφάλου κατά 19.0, 101.5, 40.9, και 12.8% αντίστοιχα, στην ομάδα των προβάτων που κατανάλωσε τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου, σε σχέση με την ομάδα των προβάτων που κατανάλωσε την κοινή ζωοτροφή.

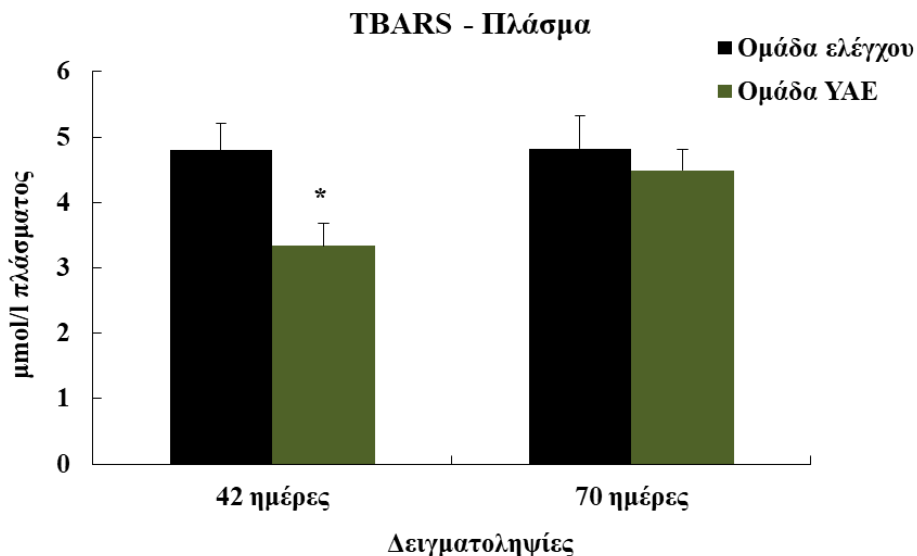
Στο Διάγραμμα 27 φαίνεται η επίδραση των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στο ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) στους ιστούς των προβάτων κατά τη διάρκεια χορήγησής τους (42 και 70 ημέρες). Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη δειγματοληψία (Διάγραμμα 27 (i)) ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά μόνο στον ιστό της καρδιάς κατά 17.3% στην ομάδα YAE σε σχέση με την

ομάδα ελέγχου, ενώ στους υπόλοιπους ιστούς δεν υπήρξε κάποια μεταβολή. Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (70 ημέρες) ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 αυξήθηκε σημαντικά στον ιστό της καρδιάς, του ήπατος και του τετρακέφαλου μυ κατά 53.1, 7.9, και 116.7% αντίστοιχα, στην ομάδα των προβάτων που λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα που λάμβανε κοινή ζωοτροφή (Διάγραμμα 27 (ii)).

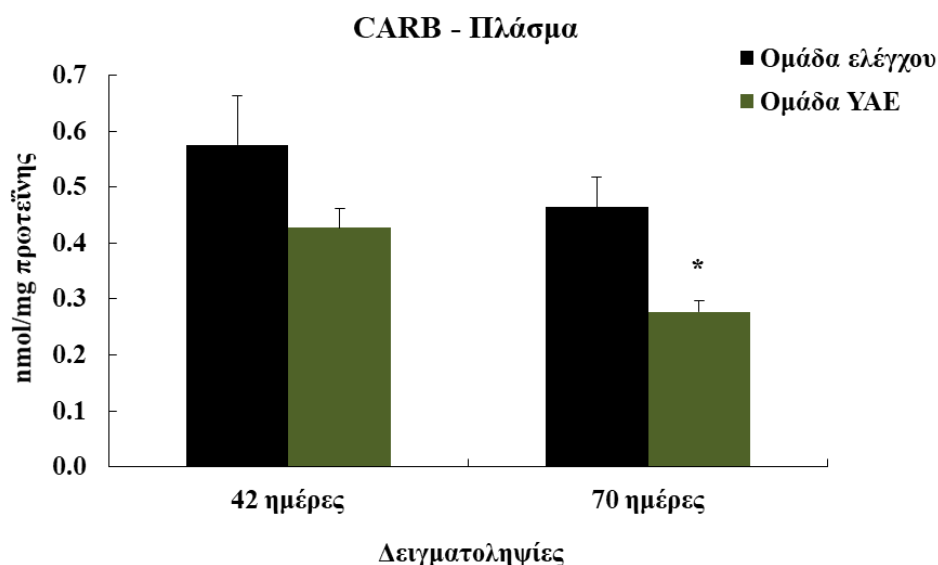
Τέλος, στο Διάγραμμα 28 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ιστών των προβάτων μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) στις δυο δειγματοληψίες. Παρατηρήθηκε ότι η TAC αυξήθηκε σημαντικά μόνο στον ιστό του εγκεφάλου και στις δύο χρονικές στιγμές (Διάγραμμα 28 (i) & (ii)) κατά 56.1 και 32.6%, αντίστοιχα στην ομάδα όπου χορηγήθηκε η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα όπου χορηγήθηκε κοινή ζωοτροφή.

5.4.2. Αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των ζωοτροφών σε οξειδωτικές βλάβες λιπιδίων και πρωτεϊνών

5.4.2.1. Αίμα



Διάγραμμα 29. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων (TBARS) στο πλάσμα των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και YAE, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

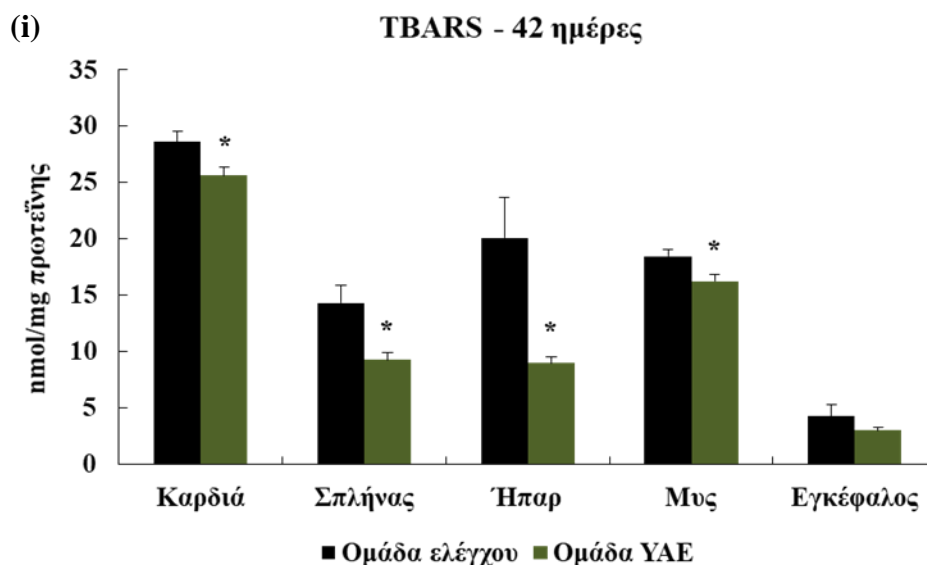


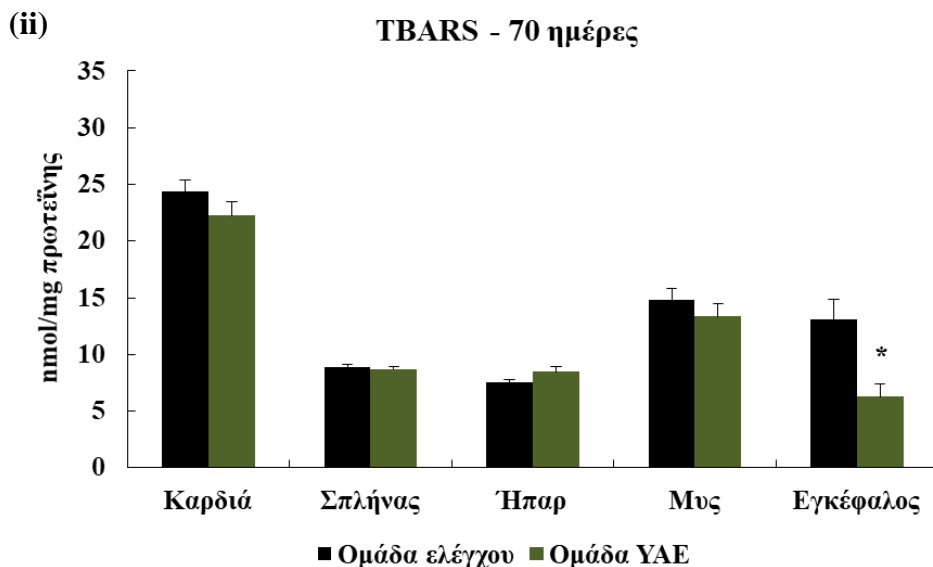
Διάγραμμα 30. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και YAE) στα επίπεδα υπεροξειδωσης πρωτεϊνών (CARB) στο πλάσμα των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και YAE, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 29 και 30 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων (TBARS) και πρωτεϊνών (CARB) στα δείγματα πλάσματος των αμνών, που λήφθηκαν κατά τις 42 και 70 ημέρες από τη γέννησή τους. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των TBARS μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 30.6% στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 42 ημέρες, ενώ στις 70 ημέρες από τη γέννηση των προβάτων δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων (Διάγραμμα 29).

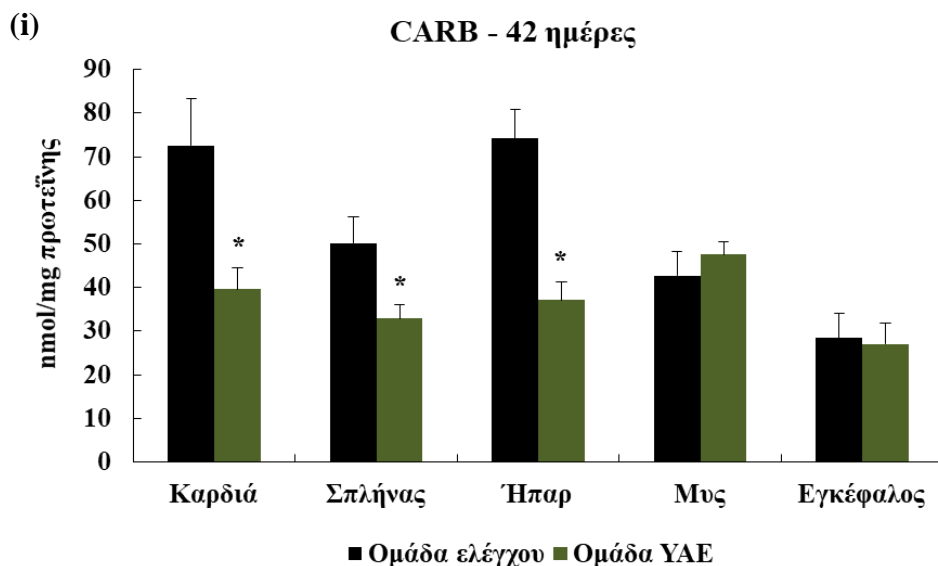
Όσον αφορά τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την υπεροξείδωση των πρωτεϊνών, μέσω της μέτρησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αυτά έδειξαν ότι τα καρβονύλια μειώθηκαν σημαντικά κατά 40.3% την 70^η ημέρα του πειράματος, στην ομάδα των προβάτων που λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Διάγραμμα 30). Στις 42 ημέρες δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα CARB.

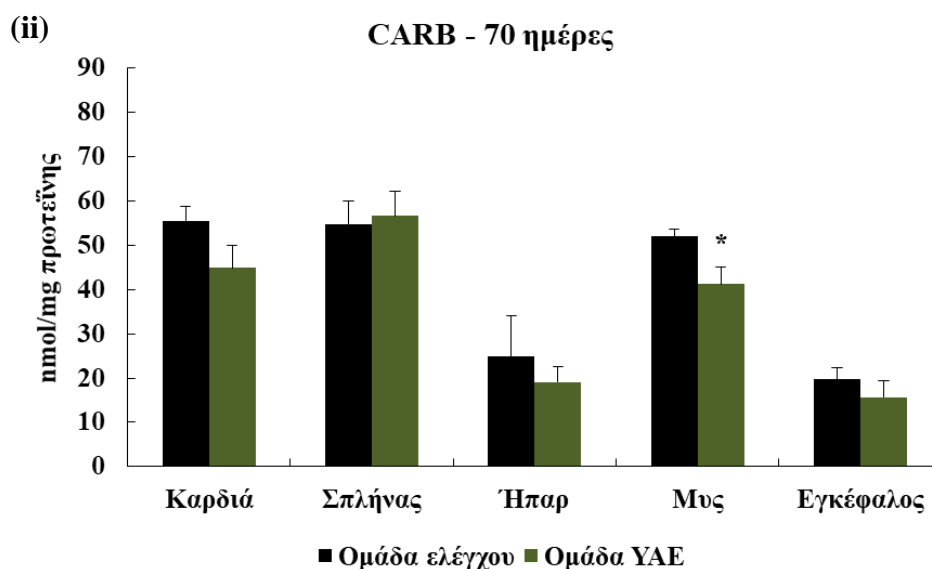
5.4.2.2. Ιστοί





Διάγραμμα 31. Επίδραση της χορήγησης των βιολεειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα οξείδωσης λιπιδίων (TBARS) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.





Διάγραμμα 32. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στα επίπεδα υπεροξειδωσίας πρωτεϊνών (CARB) των ιστών των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα διαγράμματα 31 και 32 φαίνονται οι μεταβολές στους δείκτες λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξειδωσίας (TBARS, CARB) στους ιστούς των αμνών μεταξύ των δυο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες από τη γέννησή τους). Από το διάγραμμα 31 προέκυψε ότι στις 42 ημέρες τα TBARS μειώθηκαν σημαντικά κατά 10.3, 35.2, 55.2 και 11.9% στην καρδιά, στο σπλήνα, στο ήπαρ και στον τετρακέφαλο μυ αντίστοιχα, στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 31 (i)). Από την άλλη, στις 70 ημέρες τα επίπεδα των TBARS μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 52.0% μόνο στον ιστό του εγκεφάλου, στην ομάδα των προβάτων που έλαβε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα ΥΑΕ, σε σχέση με την ομάδα των προβάτων που έλαβε το κοινό σιτηρέσιο (Διάγραμμα 31 (ii)).

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώθηκαν σημαντικά κατά 45.2, 34.3 και 50.1% στην καρδιά, στο σπλήνα και στο ήπαρ αντίστοιχα στην πρώτη δειγματοληψία (42 ημέρες), ενώ στις 70 ημέρες τα επίπεδα των CARB μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 20.3% μόνο στον ιστό του τετρακέφαλου μυ, στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

(Διάγραμμα 32 (i) & (ii)). Συγκεντρωτικά, όλα τα αποτελέσματα των βιοδεικτών στο αίμα και στους ιστούς των προβάτων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Σύνοψη αποτελεσμάτων επίδρασης της ζωοτροφής με ΥΑΕ στους βιοδείκτες των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (42 και 70 ημέρες)

Αίμα-Ιστοί Βιοδείκτες	ΑΙΜΑ		ΚΑΡΔΙΑ		ΣΠΛΗΝΑΣ		ΗΠΑΡ		ΜΥΣ		ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	
	42	70	42	70	42	70	42	70	42	70	42	70
GSH	↑	↑	↔	↑	↑	↑	↔	↔	↔	↑	↑	↑
Αποικοδόμηση H₂O₂	↔	↔	↑	↑	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔
TAC	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↑
TBARS	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↓
CARB	↔	↓	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↓	↔	↔

Τα βέλη με φορά προς τα πάνω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική αύξηση. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική μείωση. Τα αμφίδρομα βέλη υποδηλώνουν πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των δυο ομάδων την ίδια χρονική στιγμή. Η γαλάζια σκίαση αφορά μεταβολές στους δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η κόκκινη σκίαση αφορά μεταβολές στους δείκτες οξειδωτικής καταστροφής.

5.4.3. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις *in vitro* τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) και της κοινής ζωοτροφής, μέσω των μεθόδων εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (DPPH και ABTS), έδειξαν ότι η εμπλουτισμένη ζωοτροφή είχε περίπου δύο φορές υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από το κοινό σιτηρέσιο. Αυτή η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της ζωοτροφής με τα υποπροϊόντα ελαιουργείου, βασίζεται πιθανόν κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, όπως η τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καφεϊκό, βανιλικό, κουμαρικό, φερουλικό, γαλλικό, υδροξυβενζοϊκό οξύ, καμφορόλη, απιγενίνη και κερκετίνη (144). Επιπλέον, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του βάρους των αμνών των δύο ομάδων έδειξαν ότι η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα ΥΑΕ αύξησε σημαντικά το βάρος και τη σωματική απόδοση των ζώων σε σχέση με το βάρος των προβάτων που έλαβαν το κοινό σιτηρέσιο, ειδικά όταν αυτά ήταν ακόμη σε νεαρή ηλικία (42 ημερών). Σύμφωνα με τον Payne και συνεργατών, οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν και καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη βιολογικών μορίων, προκαλώντας ποικίλες βλάβες στην ακεραιότητα της μεμβράνης του εντέρου (201). Έτσι η παρατηρούμενη αύξηση του μέσου ημερήσιου κέρδους βάρους και η βελτίωση της ανάπτυξης των αμνών, μπορεί να οφείλεται στην ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ΥΑΕ να επάγει την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, με αποτέλεσμα τη μείωση της βλάβης στην εντερική μεμβράνη και συνεπώς τη βελτίωση της λειτουργικότητας του εντέρου, ενισχύοντας και την ποιότητα ζωής των προβάτων (46).



Στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου αναλύθηκαν τα αποτελέσματα σε δείγματα αίματος και πέντε ιστών, από τα πρόβατα στα οποία χορηγήθηκε η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου. Συγκεκριμένα η εμπλουτισμένη ζωοτροφή περιελάμβανε υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ). Όπως παρουσιάστηκε από την *in vitro* μελέτη των δυο

πειραματικών ζωοτροφών που παρασκευάστηκαν για χάριν της παρούσας διατριβής, η ζωοτροφή που αποτέλεσε την ομάδα των ΥΑΕ έδειξε σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την κοινή ζωοτροφή. Σκοπός λοιπόν, αυτού του μέρους ήταν να διερευνηθεί η πιθανότητα τα αποτελέσματα από τις *in vitro* τεχνικές που σχολιάστηκαν παραπάνω, να συνάδουν με αυτά της *in vivo* χορήγησης σε επίπεδο παραγωγικών, πια, ζώων, αφού εκεί μεσολαβούν παράγοντες όπως η απορρόφηση, κατανομή και ο μεταβολισμός ξеноβιοτικών ουσιών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την κατηγορία των πολυφαινολών, αφού αυτές οι ουσίες παρουσιάζουν χαμηλή απορροφητικότητα μέσα στους οργανισμούς (59).

Οι δυο ζωοτροφές (ελέγχου και ΥΑΕ) χορηγήθηκαν σε 24 πρόβατα της ελληνικής φυλής Χίου για συνολικά 55 ημέρες. Μέχρι τις 15 ημέρες, τα νεαρά πρόβατα παρέμειναν με τις μητέρες τους και λάμβαναν αποκλειστικά μητρικό γάλα, ενώ για τις επόμενες 55 ημέρες η κάθε ομάδα είχε πρόσβαση στην αντίστοιχη ζωοτροφή (ελέγχου και ΥΑΕ). Όπως και στο πείραμα με τα κοτόπουλα, πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες σε δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές (42 και 70 ημέρες) για τους ίδιους λόγους που ήδη αναφέρθηκαν: α) στις 42 ημέρες για να δούμε την επίδραση των ζωοτροφών στα πρόβατα νεαρής ηλικίας που οι αμυντικοί τους μηχανισμοί θεωρούνται ασθενείς (46,182,183) και β) οι 70 ημέρες είναι η ηλικία εκείνη που τα πρόβατα θυσιάζονται ώστε τα προϊόντα τους να προωθηθούν στην κατανάλωση (34,46). Στις δυο παραπάνω χρονικές στιγμές δειγματοληψιών πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος και 5 ιστών (καρδιά, ήπαρ, σπλήνας, τετρακέφαλος μυς και εγκέφαλος) από κάθε ζώο της κάθε ομάδας, ώστε να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες μετρήσεις, βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (151,176).

5.4.3.1. Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των βιοδεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα (γλουταθειόνη, ρυθμός αποικοδόμησης H_2O_2 , ολική αντιοξειδωτική ικανότητα), η χορήγηση της πολυφαινολικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιολιβείου, αύξησε σημαντικά τα επίπεδά τους, τόσο στο αίμα όσο και στους διάφορους ιστούς.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις επιδράσεις της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ΥΑΕ στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στον ιστό του σπλήνα και του εγκεφάλου στις 42 ημέρες μετά τη γέννηση των προβάτων. Στη δεύτερη δειγματοληψία, τα επίπεδα της GSH παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν (καρδιά, σπλήνας, εγκεφαλος, τετρακέφαλος μυς), πλην του ήπατος στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα, αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ΥΑΕ και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). Ομοίως, σε άλλες παρόμοιες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας, έδειξαν ότι ζωοτροφές που ήταν εμπλουτισμένες με πολυφαινόλες των ΥΑΕ και χορηγήθηκαν σε χοιρίδια και κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, οδήγησαν σε αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης τόσο σε δείγματα ερυθροκυττάρων όσο και σε δείγματα ιστών καρδιάς, ήπατος, τετρακέφαλου μυ, εγκεφάλου, σπληνός κλπ (146,150). Επιπλέον, οι Visioli και συνεργάτες έδειξαν ότι η κατανάλωση πολυφαινολών που περιέχονταν σε εκχύλισμα ελαιολάδου ενίσχυσε τα επίπεδα GSH στο πλάσμα υγιών εθελοντών (202). Αυτή η αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης έχει ιδιαίτερη σημασία, αφού η γλουταθειόνη αποτελεί την κύρια πηγή θειόλης στα κύτταρα και είναι ένα από τα κύρια ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια των οργανισμών που προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες (46).

Η θετική επίδραση της ζωοτροφής, που χορηγήθηκε στα πρόβατα και ήταν εμπλουτισμένη με ΥΑΕ, στα επίπεδα της GSH μπορεί να εξηγηθεί όπως και προηγουμένως ([5.4.3.1](#)), μέσω της δράσης ενζύμων που συμμετέχουν είτε στο μονοπάτι σύνθεσής της (GS και γ -GCL) είτε στο ρυθμό ανακύκλωσής της (GR, GPx) (184). Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των ενζύμων εξαρτάται κυρίως μέσω των αντιοξειδωτικών στοιχείων απόκρισης (antioxidant response elements-AREs), τα οποία είναι συγκεκριμένες αλληλουχίες cis- ενισχυτών στο DNA του οργανισμού και ρυθμίζουν τη μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (151,186). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας η χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ΥΑΕ σε πρόβατα, έδειξε ότι αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα και την πρωτεϊνική έκφραση τέτοιων ενζύμων που σχετίζονται με τα AREs, όπως η γ -GCL ή η GST (95). Επιπλέον, οι Visioli και συνεργάτες αναφέρουν ότι η επαγόμενη από τα ΥΑΕ αύξηση των επιπέδων της

γλουταθειόνης, μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης της γ -GCL και της GS μέσω των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης (202).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αβλαβές νερό και οξυγόνο οφείλεται στη δράση διαφόρων ενζύμων, όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, οι περοξειρεδοξίνες και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (34,46,156,184,201,202). Έτσι όταν πρέπει να υπολογιστεί αυτή τη μετατροπή, δεν γίνεται αναφορά στη δράση ενός μόνο ενζύμου, αλλά στο ρυθμό αποικοδόμησης του υπεροξειδίου με τη συμμετοχή του συνόλου των ενζύμων που προαναφέρθηκαν. Τα αποτελέσματα, λοιπόν που προέκυψαν από τη μέτρηση του δεύτερου δείκτη στα ερυθροκύτταρα έδειξαν ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και YAE) σε καμία από τις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 στο αίμα, μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και συγκεκριμένα εκείνους που σχετίζονται με τη γλουταθειόνη (34,46). Από την άλλη, η αποικοδόμηση του H_2O_2 φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά σε 3 από τους 5 ιστούς που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στον ιστό της καρδιάς ο ρυθμός αυξήθηκε και στις δυο χρονικές στιγμές στην ομάδα YAE σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ στον ιστό του τετρακέφαλου μυ και του ήπατος αυξήθηκε σημαντικά μόνο στις 70 ημέρες. Αυτά τα αποτελέσματα είναι πολύ σημαντικά καθώς, αν το υπεροξείδιο του υδρογόνου δε διασπαστεί σε αβλαβή προϊόντα όπως το νερό και το οξυγόνο, παρουσία μεταλλικών ιόντων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton (203). Αυτές οι αντιδράσεις είναι κρίσιμες για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και ιστών, αφού οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή βλάβη σε μακρομόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (204,205).

Τα αποτελέσματα λοιπόν, όσον αφορά το ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 παρουσίασαν μια ιστο-ειδικότητα. Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι η χορήγηση πολυφαινολών που περιέχονται στα YAE, αυξάνουν την ικανότητα αναγωγής του H_2O_2 τόσο στα ερυθροκύτταρα, όσο και σε διάφορους ιστούς. Συγκεκριμένα, πολυφαινολική σκόνη από απόβλητα ελαιοτριβείου που χορηγήθηκε μέσα στο νερό από κοτόπουλα,

αύξησε τη δραστηριότητα του ενζύμου της καταλάσης στο αίμα τους (206). Επιπλέον, όταν στην τροφή αρουραίων και χοιριδίων προστέθηκαν ΥΑΕ, ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξήθηκε σημαντικά σε ιστούς ζωτικών τους οργάνων (150,192,207). Έτσι, η επίδραση των πολυφαινόλων των ΥΑΕ στη διάσπαση του H_2O_2 εκτός του ότι εμφανίζει ιστο-ειδικότητα ανάμεσα στο ίδιο ζώο, παρουσιάζει και διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα σε διαφορετικά ζωικά είδη.

Ο τρίτος δείκτης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) που αφορά στο συνολικό επίπεδο αντιοξειδωτικών μορίων σε έναν οργανισμό, αυξήθηκε σημαντικά στο πλάσμα την 42^η ημέρα μετά τη γέννηση των αμνών στην ομάδα ΥΑΕ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η αύξηση των επιπέδων της TAC ήρθε να συμφωνήσει με την ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και με τη μείωση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων (Πίνακας 17). Αντίθετα στους ιστούς η TAC δεν διέφερε σημαντικά στην ομάδα των προβάτων που έλαβε τη ζωοτροφή με τα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η απουσία αύξησης της TAC στους ιστούς, που παρουσίασαν όμως αύξηση στη GSH, μπορεί πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι όταν ενεργοποιούνται κάποιοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μέσα στον οργανισμό, κάποιοι άλλοι μπορεί να μην επηρεάζονται χάριν κυτταρικής οικονομίας (34,46,176).

Εξαίρεση αποτέλεσε ο ιστός του εγκεφάλου, όπου εκεί τα επίπεδά της αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας μεταξύ των δυο ομάδων. Η αύξηση της TAC στον εγκέφαλο μπορεί να αποδοθεί στην παράλληλη αύξηση της γλουταθειόνης κατά τα ίδια χρονικά σημεία. Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αφού, παρόλο που μελέτες υποστηρίζουν ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου μπορούν να μειώσουν τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (208), αντίθετα υπάρχουν και εκείνες που τονίζουν ότι οι πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο, και στα υποπροϊόντα του, μπορούν να διαπεράσουν αυτό το φραγμό και να ασκήσουν μια ισχυρή προστατευτική δράση και προστασία από νευροεκφυλιστικές ασθένειες (209–211). Τα αποτελέσματα λοιπόν της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν ότι οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ ενισχύουν την αντιοξειδωτική άμυνα του εγκεφάλου των αμνών που κατανάλωσαν τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με αυτά. Επιπλέον, και σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας τα επίπεδα της TAC ήταν σημαντικώς αυξημένα σε πολλούς ιστούς, και ειδικά στον εγκέφαλο, χοιριδίων που έλαβα ζωοτροφή εμπλουτισμένη με

πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (150). Τέλος, οι Frankel και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η αύξηση των επιπέδων της TAC σε χοίρους μετά τη σίτιση με ΥΑΕ οφειλόταν στην άμεση εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες τους (144).

5.4.3.2. Επίδραση των ζωοτροφών σε δείκτες οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των βιοδεικτών, εκτός από την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που αναλύθηκε προηγουμένως, η χορήγηση της πολυφαινολικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των δεικτών που σχετίζονται με τις βλάβες που προκαλούνται σε λιπίδια και πρωτεΐνες εξ' αιτίας του οξειδωτικού στρες (TBARS, CARB). Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε τόσο στα δείγματα του αίματος των αμνών όσο και στους διάφορους ιστούς τους.

Στα βιολογικά συστήματα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων επάγει την παραγωγή προϊόντων αποικοδόμησης όπως η MDA, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο (63,205). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων στο πλάσμα των αμνών μειώθηκε σημαντικά στις 42 ημέρες από τη γέννησή τους στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτή η παρατηρούμενη μείωση των TBARS έρχεται σε συμφωνία με την ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης στην ομάδα ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή (42 ημέρες). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των ζώων στη νεαρή ηλικία των 42 ημερών είναι ασθενείς, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την ενίσχυσή τους, και έτσι αυτά τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι ιδιαίτερης σημασίας αφού φαίνεται να ενισχύουν τους μηχανισμούς αυτούς (46,176,183). Οι Metcalfe και συνεργάτες αναφέρουν ότι η πρόωμη ανάπτυξη είναι ένα στάδιο ζωής των ζώων όπου τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι υψηλά, λόγω της σχέσης μεταξύ των υψηλών μεταβολικών δραστηριοτήτων που απαιτούνται για την ανάπτυξή τους και της παραγωγής ελευθέρων ριζών (212). Επιπλέον, οι Nussey και συνεργάτες όταν συνέκριναν την οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των αμνών, παρατήρησαν ότι αυτή ήταν υψηλότερη στα πρόβατα όταν αυτά ήταν σε νεαρή ηλικία απ' ό,τι στα ενήλικα και βρήκαν θετική συσχέτιση με το ρυθμό ανάπτυξής τους στους 4 πρώτους μήνες ζωής (213).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των TBARS στους διάφορους ιστούς, η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μείωσε την λιπιδική υπεροξειδωση στον ιστό της καρδιάς, του σπλήνα, του ήπατος και του τετρακέφαλου μυ κατά την πρώτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας, και μόνο στον ιστό του εγκεφάλου στις 70 ημέρες, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όπως και στο πλάσμα, αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την αύξηση της γλουταθειόνης σε αυτούς τους ιστούς (Πίνακας 17). Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας φάνηκε ότι η χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ΥΑΕ σε παραγωγικά ζώα, όπως χοιρίδια και κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων στο αίμα και σε διάφορους ιστούς που μελετήθηκαν (καρδιά, εγκεφαλος, σπλήνας, ήπαρ, νεφρό κ.α.) (146,150). Όπως σχολιάστηκε και προηγουμένως, έχει ιδιαίτερη σημασία η οξειδοαναγωγική κατάσταση του ιστού του εγκεφάλου, αφού αυξάνεται η GSH, η TAC και μειώνονται τα TBARS, το οποίο αποδεικνύει τελικά ότι οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και προστατεύουν τον εγκέφαλο από βλάβες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (209–211,214).

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων εκτός από την επιβάρυνση που προκαλεί στην υγεία των ζώων, πολλές φορές ευθύνεται και για τη μείωση της ποιότητας των προϊόντων κρέατος που παράγεται από αυτά, αφού αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες αλλοίωσης της γεύσης και της θρεπτικής τους αξίας (196,197). Σημαντικές πολυφαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στα ΥΑΕ, όπως η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη, έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνες για τη μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (146,215). Σε πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας φάνηκε ότι ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ μείωσε την αναλογία ω-6/ω-3 λιπαρών οξέων σε ζωτικά όργανα χοιριδίων (216). Εξ' αιτίας του γεγονότος ότι τα λιπαρά οξέα επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα του κρέατος, η παρατηρούμενη μείωση του λόγου ω-6/ω-3 λιπαρών οξέων οδήγησε σε θρεπτικά εμπλουτισμένο κρέας υψηλής περιεκτικότητας σε επιθυμητά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) (216,217). Έτσι, η μείωση των TBARS στον τετρακέφαλο μυ στην ομάδα των αμνών που κατανάλωσε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ είναι ιδιαίτερης σημασίας εύρημα, αφού αποτελεί το κύριο βρώσιμο μέρος του ζώου αυτού.

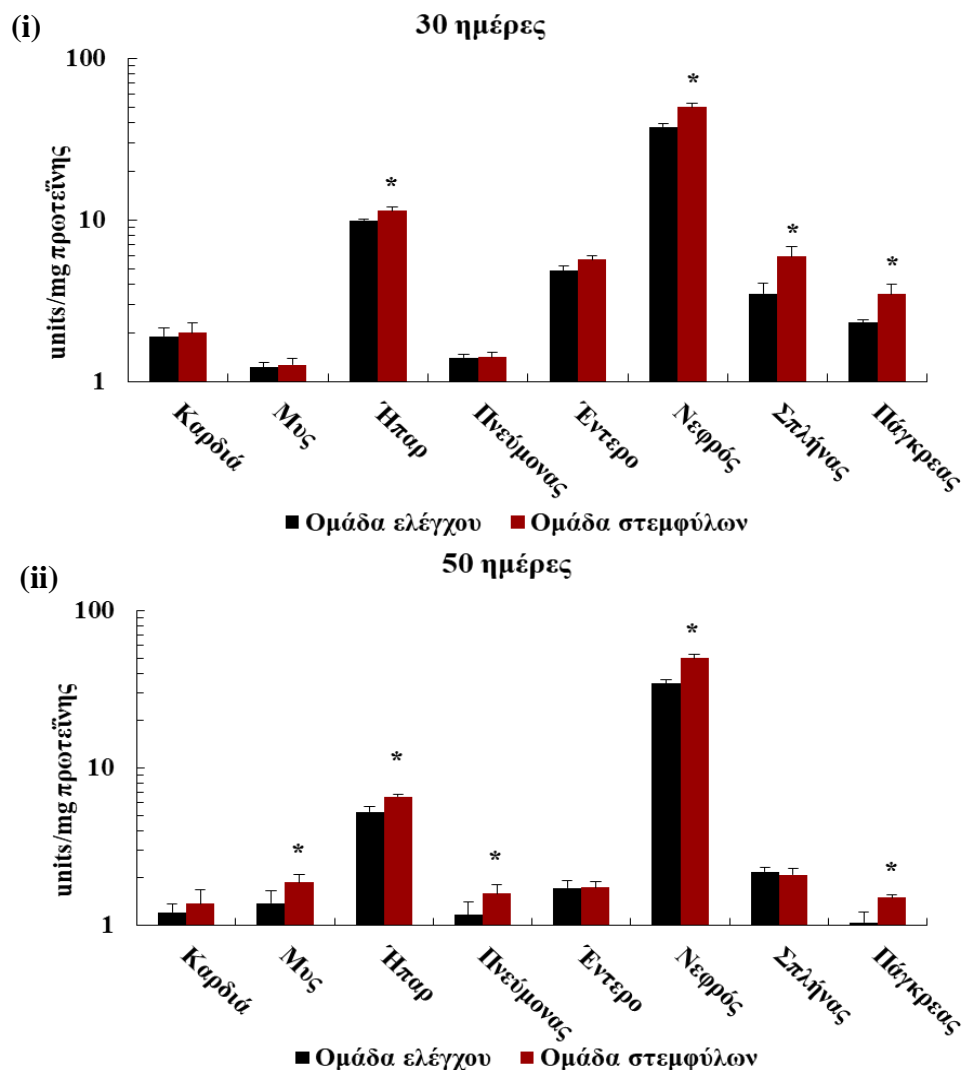
Τέλος, τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη δράση των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στην οξειδωση των πρωτεϊνών, έδειξαν ότι η ζωοτροφή με τα υγρά απόβλητα

ελαιοτριβείου μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, και άρα την πρωτεϊνική οξειδωση, στο πλάσμα του αίματος στις 70 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 17). Στους ιστούς, τα επίπεδα των καρβονυλίων μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά στην καρδιά, στο σπλήνα και το ήπαρ στην πρώτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (42 ημέρες), και στον ιστό του τετρακέφαλου μυ στις 70 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, στην ομάδα ΥΑΕ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρόμοιες ερευνητικές μελέτες έδειξαν ότι η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα ΥΑΕ μείωσε αυτά τα επίπεδα τόσο στο αίμα, όσο και σε πολλούς ιστούς χοιριδίων και κοτόπουλων που κατανάλωσαν τη συγκεκριμένη τροφή, σε σχέση με εκείνα που είχαν λάβει το κοινό σιτηρέσιο (146,150). Οι Zhang και συνεργάτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει πολυμερισμό και συσσωμάτωσή τους, επηρεάζοντας έτσι την πεπτικότητά τους, γεγονός που αλλοιώνει και αυτό τη θρεπτική αξία των παραγόμενων ζωικών τους προϊόντων. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι και η οξειδωση των απαραίτητων αμινοξέων των πρωτεϊνών του κρέατος, όπως η κυστεΐνη, τυροσίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, αλανίνη, λευκίνη, λυσίνη, μπορεί να μειώσει την ποιότητα του κρέατος (200). Έτσι, η παρατηρούμενη μείωση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στον τετρακέφαλο μυ στην ομάδα των προβάτων που έλαβε τη ζωοτροφή με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, υποδεικνύει μια πιθανή βελτίωση της ποιότητας του κρέατος, αφού ο ιστός αυτός αποτελεί βρώσιμο μέρος του ζώου και οι 70 ημέρες είναι η χρονική στιγμή που τα πρόβατα θυσιάζονται για κατανάλωση.

5.5. Δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ιστούς των ζώων

5.5.1. Αποτελέσματα GST, SOD και γ-GCL στους ιστούς των κοτόπουλων – Ζωοτροφή με στέμφυλα

5.5.1.1. Δραστικότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST)

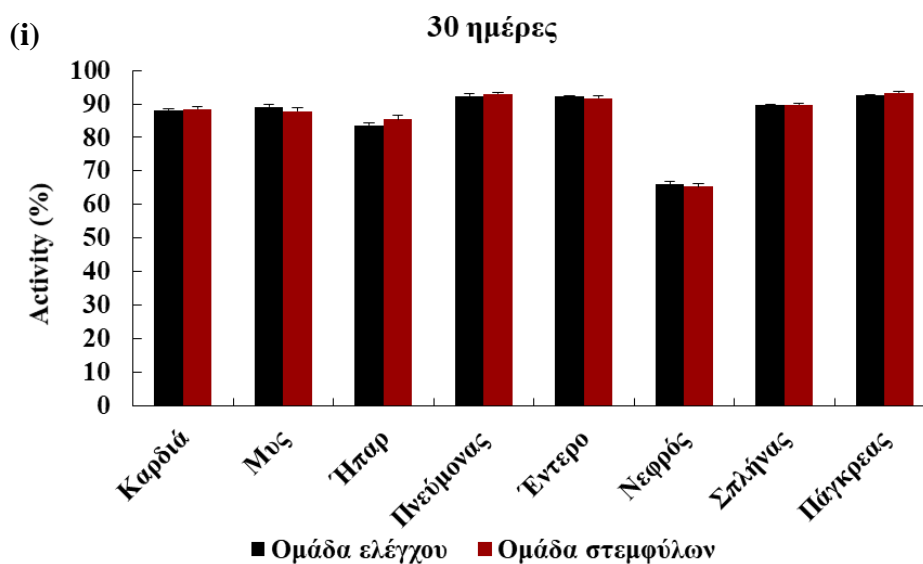


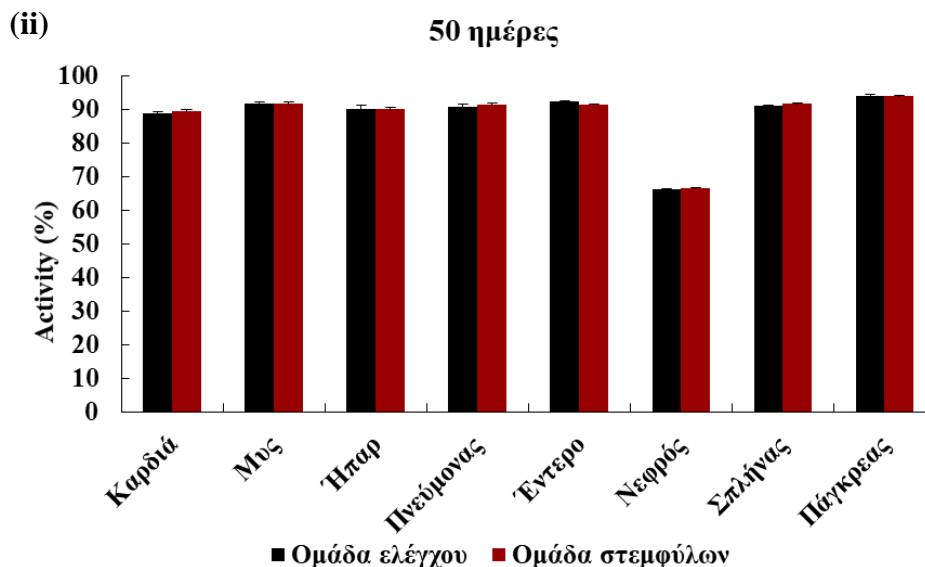
Διάγραμμα 33. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στη δραστικότητα της GST σε ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους.

*Στατιστικός σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο διάγραμμα 33 φαίνονται τα αποτελέσματα που αφορούν τη δραστικότητα της S – τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στους ιστούς των κοτόπουλων μεταξύ της ομάδας των στεμφύλων και της ομάδας ελέγχου, στις δυο χρονικές στιγμές (30 και 50 ημέρες από τη γέννηση). Πιο αναλυτικά, κατά την πρώτη δειγματοληψία (30 ημέρες) η δραστικότητα της GST αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά κατά 14,6, 33,2, 69,8 και 50,4% στο ήπαρ, στο νεφρό, στο σπλήνα και στο πάγκρεας αντίστοιχα, στην ομάδα που λάμβανε την εμπλουτισμένη ζωοτροφή με στέμφυλα, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 33 (i)). Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (50 ημέρες) η δραστικότητα της GST αυξήθηκε σημαντικά στο ήπαρ, στο νεφρό, στο πάγκρεας, στον τετρακέφαλο μυ και στον πνεύμονα κατά 25,5, 44,0, 44,2, 20,6 και 76,0% αντίστοιχα στην ομάδα των στεμφύλων (Διάγραμμα 33 (ii)).

5.5.1.2. Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

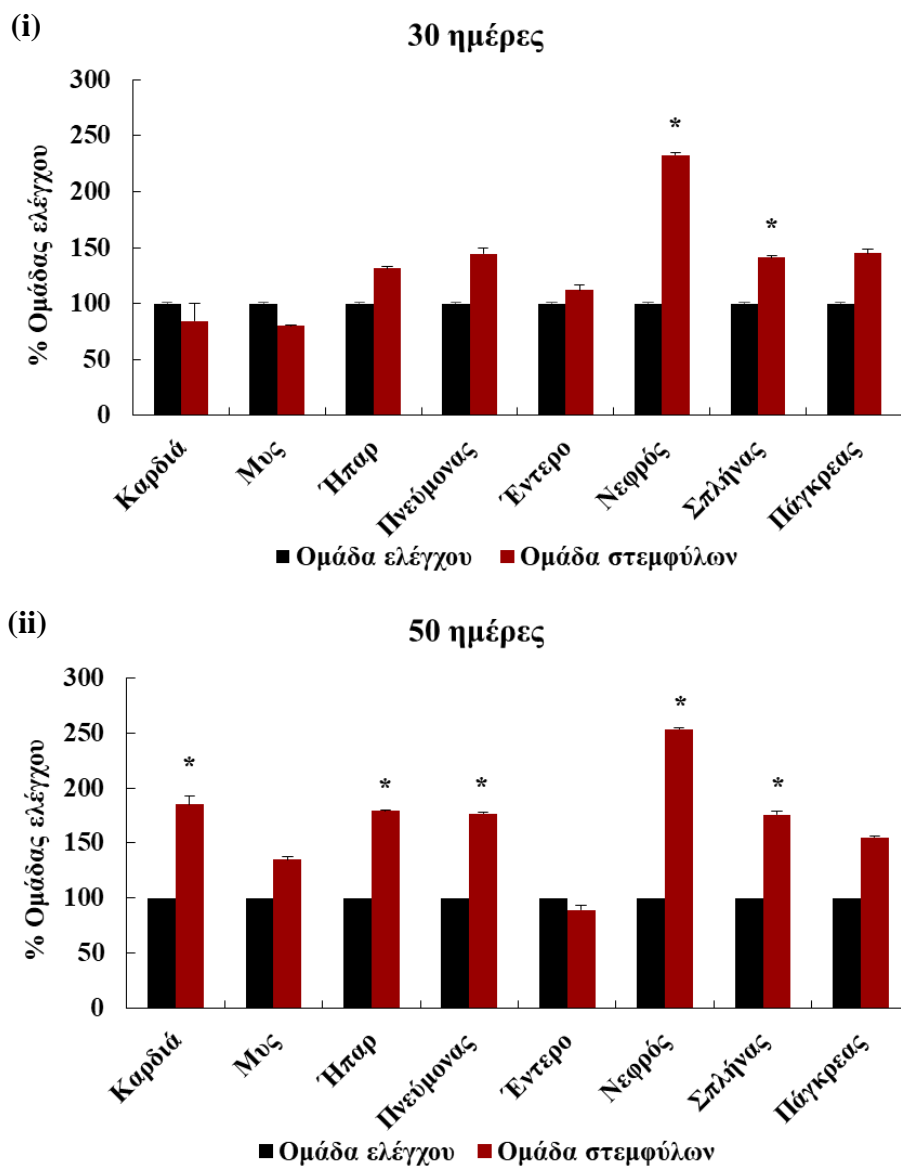




Διάγραμμα 34. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στη δραστηριότητα της SOD σε ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο διάγραμμα 34 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τη δραστηριότητα της SOD στους ιστούς των κοτόπουλων ανάμεσα στις δυο ομάδες (ελέγχου και στεμφύλων) κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Όπως φαίνεται, τόσο στις 30 (Διάγραμμα 34 (i)), όσο και στις 50 ημέρες (Διάγραμμα 34 (ii)) τα επίπεδα δραστηριότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ της ομάδας στεμφύλων και της ομάδας ελέγχου σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές λήψης των δειγμάτων.

5.5.1.3. Πρωτεϊνική έκφραση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (γ-GCL)



Διάγραμμα 35. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων) στην πρωτεϊνική έκφραση της γ-GCL στους ιστούς των κοτόπουλων (i) στις 30 και (ii) στις 50 ημέρες από τη γέννησή τους. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα ελέγχου. Σαν μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και στεμφύλων, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -γλουταμινοκυστεΐνης (γ -GCL) στους ιστούς από τα κοτόπουλα, έπειτα από τη χορήγηση των δυο ζωοτροφών (ελέγχου και στεμφύλων). Αναλυτικότερα, στις 30 ημέρες (Διάγραμμα 35 (i)) η γ -GCL αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στον ιστό του νεφρού και του σπλήνα κατά 132.5 και 41.0% αντίστοιχα, στα κοτόπουλα που έλαβαν τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα οινοποίησης σε σχέση με εκείνα που έλαβαν την κοινή ζωοτροφή. Επιπλέον, στις 50 ημέρες (Διάγραμμα 35 (ii)) τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCL αυξήθηκαν σημαντικά στην καρδιά, στο ήπαρ, στον πνεύμονα, στο νεφρό, στο σπλήνα και στο πάγκρεας κατά 84.9, 79.2, 76.8, 153.3 και 75.5% αντίστοιχα στην ομάδα των στεμφύλων, ως προς την ομάδα ελέγχου.

Συγκεντρωτικά, όλα τα αποτελέσματα που αφορούν το οξειδοαναγωγικό προφίλ (δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, δραστηριότητα και πρωτεϊνική έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων) των ιστών των κοτόπουλων, απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης της ζootροφής με στέμφυλα στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ιστών των κοτόπουλων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (30 και 50 ημέρες)

Βιοδείκτες \ Ιστοί	ΚΑΡΔΙΑ		ΜΥΣ		ΗΠΑΡ		ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ		ΕΝΤΕΡΟ		ΝΕΦΡΟΣ		ΣΠΛΗΝΑΣ		ΠΑΓΚΡΕΑΣ	
	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50	30	50
GSH	↔	↑	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↔	↔
γ-GCL	↔	↑	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔	↑	↑	↑	↑	↔	↔
GST	↔	↔	↔	↑	↑	↑	↔	↑	↔	↔	↑	↑	↑	↔	↑	↑
SOD	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Αποικοδόμηση H₂O₂	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↔	↔
TAC	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔
TBARS	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↔
CARB	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↑	↓	↔	↔

Τα βέλη με φορά προς τα πάνω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική αύξηση. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική μείωση.

Τα αμφίδρομα βέλη υποδηλώνουν πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των δυο ομάδων την ίδια χρονική στιγμή.

5.5.2. Συζήτηση

Σε αυτό το κομμάτι της διατριβής αξιολογήθηκαν οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα οινοποίησης-στέμφυλα, όταν αυτή χορηγήθηκε σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής νεαρής ηλικίας. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι σε οικόσιτα ζώα το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν σημαντικά την ευζωία και την παραγωγικότητά τους (97,218). Η ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών ουσιών στη διατροφή τους μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση αυτών των παθολογικών καταστάσεων. Βιβλιογραφικές μελέτες επικεντρώνονται στις ευεργετικές ιδιότητες των παραπροϊόντων οινοποίησης στην υγεία των ζώων, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης βάσει της υψηλής τους περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (153,219,220). Στα προηγούμενα αποτελέσματα, στα κοτόπουλα που χορηγήθηκε η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με στέμφυλα, βελτιώθηκε η οξειδοαναγωγική κατάστασή τους (34). Επομένως, σκοπός ήταν η μελέτη των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα εμφάνισε ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορους ιστούς των κοτόπουλων, προσδιορίζοντας την ενζυμική δραστηριότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Επιπλέον, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) εκτιμήθηκαν και τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της γ-GCL. Η γενική εικόνα της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με τα στέμφυλα έδειξε ότι άσκησε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενισχύοντας το οξειδοαναγωγικό προφίλ των ζωτικών οργάνων των κοτόπουλων με ιστο-ειδικό τρόπο. Από τα αποτελέσματα φάνηκε επίσης ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι και ο ρυθμός ανακύκλωσης της γλουταθειόνης, μπορεί εν μέρει να σχετιστεί με τις ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών που περιέχονται στα στέμφυλα όπως φάνηκε από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στους ιστούς και αφορούσαν δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, ιστοί από ζωτικά όργανα 30 κοτόπουλων, ηλικίας 2 ημερών (καρδιά, τετρακέφαλος μυς, ήπαρ, πνεύμονας, έντερο, νεφρός, σπλήνας, πάγκρεας) συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των επιδράσεων της βιολειτουργικής εμπλουτισμένης ζωοτροφής με στέμφυλα, στην οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Πραγματοποιήθηκαν δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας για τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί, αφού είναι σημαντικό να

μελετηθούν και να ενισχυθούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των ζώων σε νεαρή ηλικία, και από την άλλη οι 50 ημέρες είναι οι μέρες που τα ζώα θυσιάζονται για την προώθησή τους στην κατανάλωση (34,96,97,182,183). Έτσι κρίνεται σημαντικός ο προσδιορισμός του οξειδοαναγωγικού προφίλ των κοτόπουλων σε ποικιλία ιστών και στην ώριμη ηλικία τους αφού στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ότι το οξειδωτικό στρες ευθύνεται για την αλλοίωση της γεύσης και της θρεπτικής αξίας του κρέατος (196,197,216).

Η εκτίμηση της δραστηριότητας της GST και της SOD, καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL είναι ιδιαίτερης σημασίας, αφού αποτελούν τους τρεις από τους πιο σημαντικούς βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (95). Συγκεκριμένα, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) είναι ένζυμο της φάσης II του μεταβολισμού και ευθύνεται για την απομάκρυνση ξενοβιοτικών και ηλεκτροφιλικών ενώσεων στους ζωντανούς οργανισμούς, χρησιμοποιώντας το μόριο της γλουταθειόνης (GSH) (221,222). Χαρακτηριστικό των αντιδράσεων που συμμετέχει η GST είναι ότι απαιτείται η ενεργοποίηση του ατόμου θείου της γλουταθειόνης (GSH) στο θειολικό ανιόν (GS⁻, ένα ισχυρό πυρηνόφιλο που προσβάλλει ηλεκτρόφιλα υποστρώματα), καταλύει δηλαδή τη σύζευξη της θειολικής ομάδας της GSH (221). Από την άλλη, η γ -γλουταμινοκυστεΐνη (γ -GCL) είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της γλουταθειόνης. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της GSH από τα αμινοξέα, περιλαμβάνει δυο ενζυμικά στάδια: το πρώτο αφορά το σχηματισμό της γ -γλουταμιλ-κυστεΐνης από το γλουταμικό οξύ και την κυστεΐνη, ένα στάδιο που καταλύεται από τη γ -GCL, και το δεύτερο στάδιο αφορά το σχηματισμό της GSH από τη γ -γλουταμιλοκυστεΐνη και τη γλυκίνη που καταλύεται από τη συνθάση της GSH (GS) (223).

Γενικά, από τα αποτελέσματα των μετρήσεων στους ιστούς των κοτόπουλων, φάνηκε ότι η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα οινοποίησης-στέμφυλα, είχε ωφέλιμη δράση σε όλους τους μελετηθέντες ιστούς μέσω, εν μέρει, της GSH και του μονοπατιού βιοσύνθεσής της. Πιο αναλυτικά, στις 30 ημέρες η δραστηριότητα της GST αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα στεμφύλων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μόνο στο ιστό του ήπατος, του νεφρού και του παγκρέατος. Στον ιστό του νεφρού και του σπλήνα παρατηρήθηκε και αύξηση των επιπέδων της γ -GCL των κοτόπουλων που έλαβαν την εμπλουτισμένη ζωοτροφή σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε το κοινό σιτηρέσιο, στην ίδια χρονική στιγμή. Σε αυτούς του δύο ιστούς (νεφρός και σπλήνας) παρατηρήθηκε

από τις προηγούμενες μετρήσεις των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης και παράλληλη αύξηση των επιπέδων της GSH κατά την πρώτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (Πίνακας 16) ενώ στους υπόλοιπους δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή (34). Από την άλλη, στις 70 ημέρες η δραστικότητα της GST ήταν σημαντικά αυξημένη στον τετρακέφαλο μυ, στο ήπαρ, στον πνεύμονα, στο νεφρό και στο πάγκρεας. Στον ιστό της καρδιάς και του εντέρου δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα στεμφύλων και ελέγχου σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Επιπλέον, η πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL στη δεύτερη δειγματοληψία αυξήθηκε σημαντικά στον ιστό της καρδιάς, του ήπατος, του πνεύμονα, του νεφρού και του σπλήνα, ενώ καμία μεταβολή δεν είχε στον τετρακέφαλο μυ, στο έντερο και στο πάγκρεας.

Συνδυάζοντας και τις προηγούμενες μετρήσεις των δεικτών που έγιναν σε αυτούς τους ιστούς, αυτό που παρατηρήθηκε σε γενικές γραμμές ήταν ότι στους ιστούς που υπήρχε αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, παρατηρήθηκε και αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCL. Δεδομένου ότι η GST προκειμένου να απομακρύνει τις ξενοβιοτικές ουσίες από τον οργανισμό, χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη, θα ήταν αναμενόμενο τα επίπεδά της να είναι σημαντικά μειωμένα. Παρόλα αυτά είτε αυξάνονται σημαντικά (π.χ. νεφρός, σπλήνας, ήπαρ, πνεύμονας, καρδιά) είτε δε μεταβάλλονται καθόλου. Από τη μία, η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης στους ιστούς, παρόλη την παράλληλη αύξηση και της δραστικότητας της GST, μπορεί να εξηγηθεί από τα παρατηρούμενα αυξημένα επίπεδα της γ -GCL, αφού είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεσή της (95,223). Από την άλλη, οι μη παρατηρούμενες μεταβολές των επιπέδων της γλουταθειόνης στους υπόλοιπους ιστούς όπου σημειώθηκε αυξημένη δραστικότητα της GST, πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση ενζύμων που συμμετέχουν στο ρυθμό ανακύκλωσης της GSH, όπως είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ή η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (34,95). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η χορήγηση παραπροϊόντων οινοποίησης σε ζωοτροφές αυξάνει τη δραστικότητα τέτοιων ενζύμων. Συγκεκριμένα, σε αρουραίους που ακολούθησαν δίαιτα εμπλουτισμένη με παραπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα, σπόρους, φλούδες) παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της GPx και της GST στον ιστό του ήπατος (224,225). Επιπλέον οι Lingua και συνεργάτες στη μελέτη τους

υποστηρίζουν ότι πολυφαινόλες που περιέχονται στα σταφύλια, στο κρασί, αλλά και στα στέμφυλα ήταν υπεύθυνες για την προστασία ζυμομυκήτων από βλάβες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, μέσω της επαγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η GR και η GPx (226). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος από εθελοντές, φάνηκε ότι η δραστηριότητα και η ενζυμική έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (GR, GPx) αυξήθηκε σημαντικά έπειτα από κατανάλωση κόκκινου κρασιού, γεγονός σημαντικό για την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με τη δράση ελευθέρων ριζών (227–229). Από την άλλη, υπάρχουν και διάφορες μελέτες, τόσο σε πειραματόζωα, όσο και σε κυτταρικές σειρές, που υποστηρίζουν ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων που προέρχονται από παραπροϊόντα οινοποίησης δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα τέτοιων ενζύμων (SOD, CAT, GR). Η παρατηρούμενη βελτιωμένη οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων εξ' αιτίας τέτοιων εκχυλισμάτων, πιθανόν να οφείλεται σε ένζυμα που συμμετέχουν στην οδό βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης παρά στη δραστηριότητα GPx/GR, προστατεύοντάς τα από οξειδωτικές βλάβες (224,230).

Τα παρατηρούμενα ιστο-ειδικά αποτελέσματα στη δραστηριότητα της GST και της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCL μπορούν τελικά να οφείλονται στην ενεργοποίηση άλλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών, χάριν κυτταρικής οικονομίας (34,46,95,176). Επιπλέον η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ -GCL στους ιστούς των κοτόπουλων που έλαβαν την εμπλουτισμένη με στέμφυλα ζωοτροφή, μπορεί να οδηγήσει στη *de novo* σύνθεση της γλουταθειόνης, προκειμένου να εξισορροπηθεί η πιθανή της μείωση από την παράλληλη αύξηση της δραστηριότητας της GST. Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας παρατηρήθηκε ότι βιολειτουργικές ζωοτροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες υποπροϊόντων οινοποίησης και ελαιοτριβείου, επηρέασαν τα επίπεδα αυτών των ενζύμων και ενίσχυσαν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ζώων, μέσω των αυξημένων επιπέδων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής (34,46,146,150,151,176,206). Επιπλέον οι Goutzourelas και συνεργάτες απέδειξαν σε μελέτη τους ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στον πυρήνα των σταφυλιών, ένα παραπροϊόν επεξεργασίας του οίνου, αυξάνουν τα επίπεδα της γ -GCL (γ -γλουταμυλοκυστεΐνης) και τη δραστηριότητα της GST, σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα (177).

Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται να συμφωνήσουν με μια επίσης προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας όπου εκχύλισμα στεμφύλων αύξησε τα επίπεδα της γ -GCL και τη δραστικότητα της GST, όταν χορηγήθηκε σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα (178). Οι Choi και συνεργάτες στη μελέτη τους αναφέρουν επίσης την ευεργετική δράση των στεμφύλων στη δραστικότητα της GST στο ήπαρ κονίκλων (231). Σε ιστούς όπως το πάγκρεας και ο τετρακέφαλος μυς, όπου ενώ η δραστικότητα της GST ήταν αυξημένη, ενώ τα επίπεδα της γ -GCL δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή, θα ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα της γλουταθειόνης να έχουν μειωθεί. Αντ' αυτού σε αυτούς τους ιστούς δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή μεταξύ της ομάδας στεμφύλων και ελέγχου, σε καμία από τις δυο δειγματοληψίες (30 και 50 ημέρες). Αυτή η αντίθεση μπορεί να εξηγηθεί αν ο σχηματισμός της γλουταθειόνης ακολουθεί μια διαφορετική οδό που δε βασίζεται στη *de novo* σύνθεσή της (95). Για παράδειγμα, όπως έχει προαναφερθεί, η γλουταθειόνη μπορεί να αναγεννηθεί από την οξειδωμένη της μορφή (GSSG) με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Η GR είναι το βασικό ένζυμο του μεταβολισμού της γλουταθειόνης αφού καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH, η οποία είναι μια κρίσιμη αντίδραση στη διατήρηση του αναγωγικού περιβάλλοντος των κυττάρων (167). Σε άλλες μελέτες αναφέρεται επίσης η δράση των πολυφαινολών στη δραστικότητα τέτοιων ενζύμων. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα σταφυλιών από διάφορες ποικιλίες αύξησαν τη δραστικότητα της GR και της GST, καθώς και τα επίπεδα της GSH στον ηπατικό ιστό αιγών (232). Επιπλέον, μια ακόμη μελέτη αναφέρει ότι η κερκετίνη, ένα γνωστό φλαβονοειδές που απαντάται στα σταφύλια, επήγαγε την ενζυμική δραστικότητα της GR στο ήπαρ αρουραίων που είχαν χρόνια έκθεση σε αιθανόλη (233). Η χορήγηση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από άλλα φυτικά είδη (π.χ. πράσινου τσαγιού) σε αρουραίους με ηπατική βλάβη επαγόμενη από CCl₄ οδήγησε σε σημαντικά αυξημένη δραστικότητα της GR (234). Οι Skrzydlewska και συνεργάτες έδειξαν επίσης ότι η χορήγηση από του στόματος πράσινου τσαγιού αύξησε επίσης σημαντικά τη δραστικότητα της GR στον ιστό του ήπατος αρουραίων (235).

Εκτός από τα ένζυμα που σχετίζονται με το βιοσυνθετικό μονοπάτι της GSH προσδιορίστηκε και η ενζυμική δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Η SOD είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των ριζών σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), περιορίζοντας την ενδοκυτταρική παραγωγή

τους, και παίζει σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα των οργανισμών έναντι του οξειδωτικού στρες (236,237). Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η δραστηριότητά της δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά σε κανέναν από τους ιστούς των κοτόπουλων ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στεμφύλων, σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνάδουν με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, όταν πολυφαινόλες που περιέχονται στον καφέ, και στα υποπροϊόντα βιομηχανίας παραγωγής κρασιού χορηγήθηκαν τόσο σε διάφορες κυτταρικές σειρές, όσο και σε ιστούς προβάτων (ήπαρ, σπλήνα, καρδιά κλπ), η γονιδιακή έκφραση της SOD δεν είχε καμία σημαντική διαφορά (95,177,238). Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου όπου σε αρουραίους χορηγήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα καφέ, τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της SOD αυξήθηκαν σημαντικά στον ιστό του εγκεφάλου, γεγονός που ενισχύει το αντιοξειδωτικό σύστημα με θετικές επιδράσεις σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπου το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο (239,240).

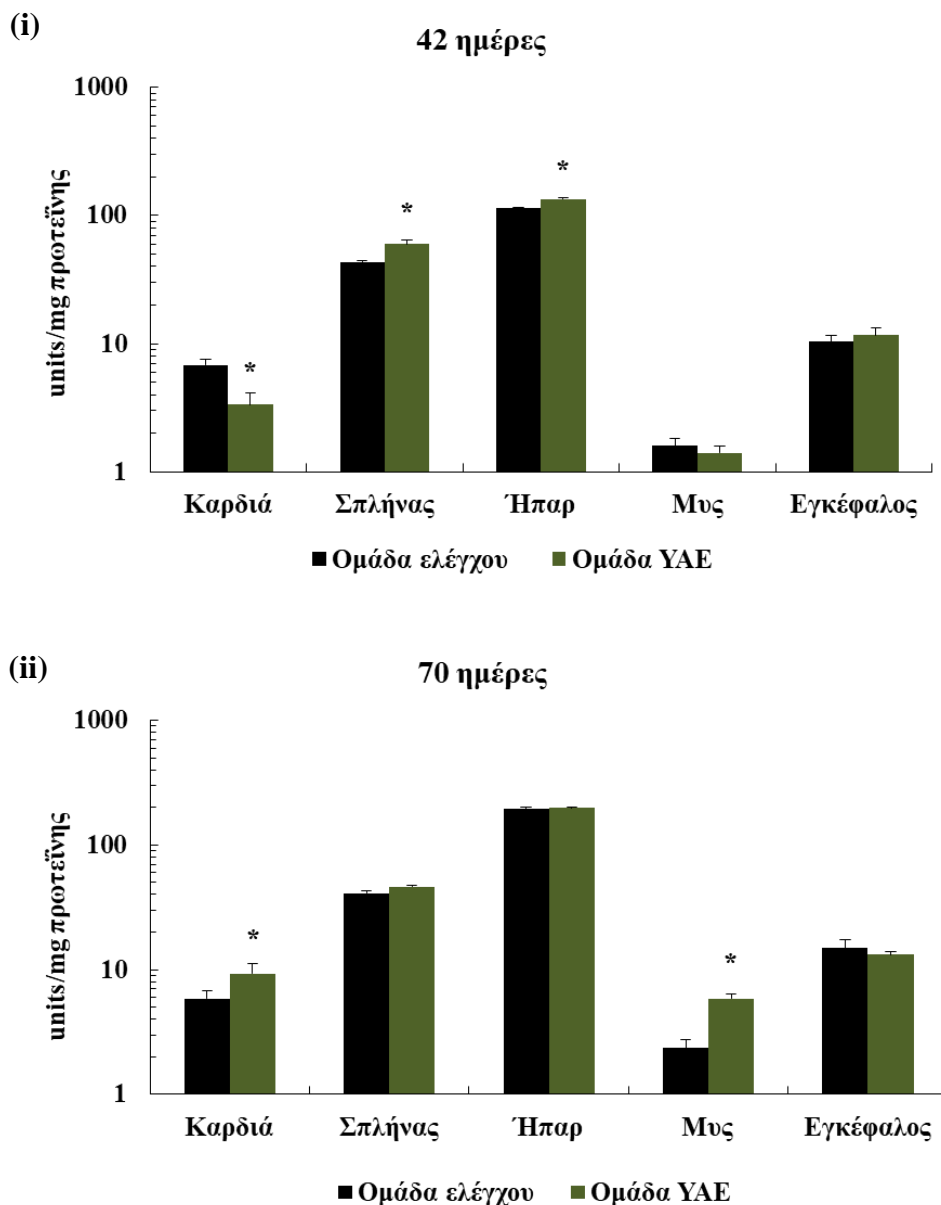
Τα ευεργετικά αποτελέσματα της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών των κοτόπουλων αποδίδεται ενδεχομένως στην υψηλή τους περιεκτικότητα, όπως φάνηκε και από τις *in vitro* τεχνικές (173). Οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί ότι είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων της φάσης I και II του μεταβολισμού και ιδιαίτερα εκείνων που σχετίζονται με τη γλουταθειόνη (239,241). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν αποδείξει την ευεργετική επίδραση διαφόρων πολυφαινολών σε ιστούς αρουραίων. Για παράδειγμα, οι Yousef και συνεργάτες επισημαίνουν ότι η χορήγηση κερκετίνης και κουρκουμίνης σε αρουραίους προστάτεψε το ήπαρ και το νεφρό από οξειδωτική βλάβη επαγόμενη από παρακεταμόλη, αυξάνοντας τη δραστηριότητα της GST (242). Φλαβονοειδή όπως ρουτίνη και σιλυμαρίνη, πολυφαινόλες του φυτού *Pisonia aculeata* L και του πράσινου τσαγιού έχει βρεθεί ότι αυξάνουν σημαντικά τη δραστηριότητα της GST, όσο και τη γονιδιακή της έκφραση στο ήπαρ αρουραίων (243–245). Επίσης, διατροφική παρέμβαση με ρεσβερατρόλη, σημαντική πολυφαινόλη των σταφυλιών, ενίσχυσε τη γονιδιακή έκφραση και τη δραστηριότητα της GST σε ιστούς αρουραίων (246).

Τελικά, αυτό που παρατηρήθηκε από το σύνολο των μετρήσεων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς των κοτόπουλων έπειτα από χορήγηση

βιολειτουργικής ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα, ήταν ότι ο κάθε ιστός παρουσίασε διαφορετική απόκριση στο οξειδωτικό στρες, μεταβάλλοντας ή όχι διαφορετικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

5.5.3. Αποτελέσματα GST, SOD και γ-GCL στους ιστούς των προβάτων – Ζωοτροφή με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)

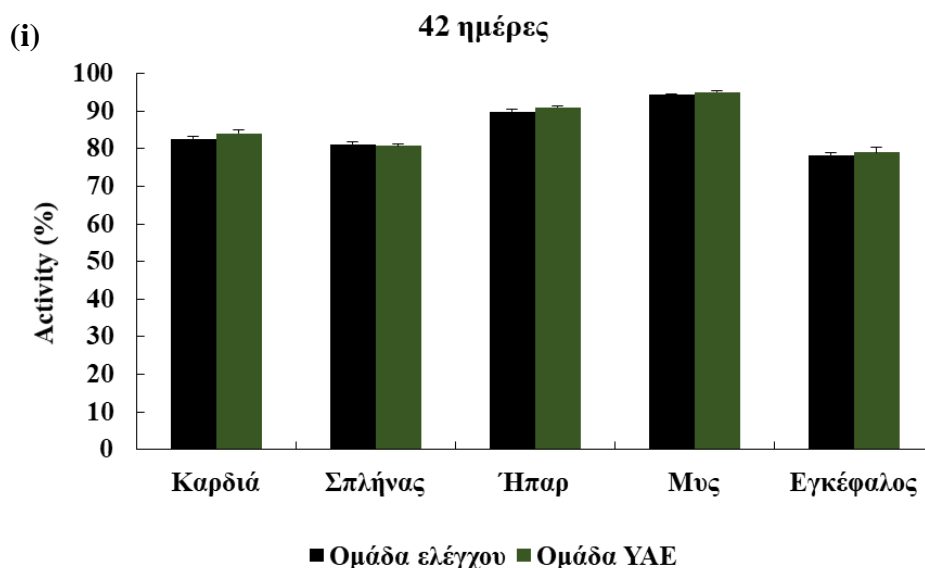
5.5.3.1. Δραστικότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST)

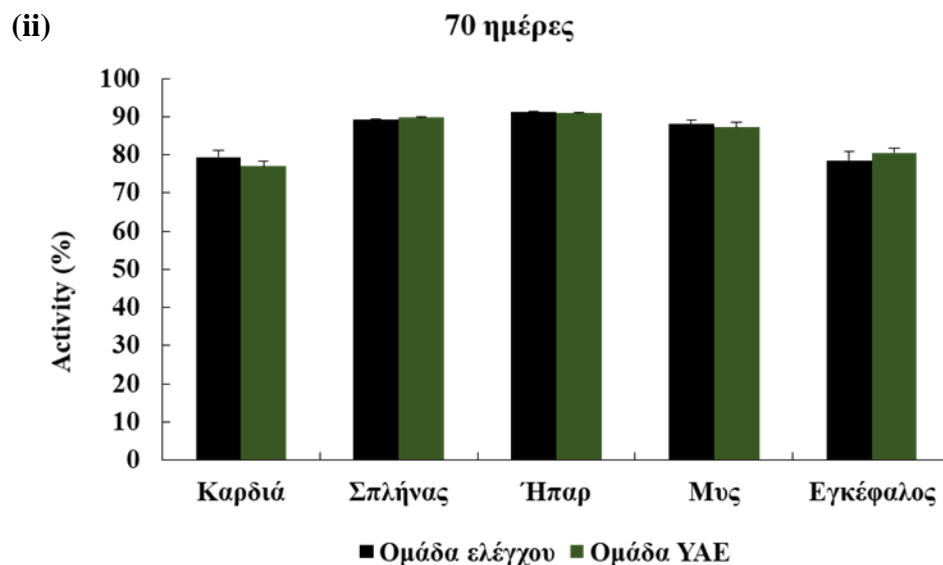


Διάγραμμα 36. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στη δραστικότητα της GST σε ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο Διάγραμμα 36 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που είχε η χορήγηση των δυο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) σε ιστούς των προβάτων στη δραστικότητα της GST. Συγκεκριμένα, η δραστικότητα της GST αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στο σπλήνα και στο ήπαρ κατά 17.8 και 37.7% αντίστοιχα, στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 36 (i)). Όσον αφορά τον ιστό της καρδιάς, ενώ στις 42 ημέρες μειώθηκε σημαντικά κατά 51%, αντίθετα στις 70 ημέρες τα επίπεδα δραστικότητας της GST αυξήθηκαν σημαντικά κατά 58.6% στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, στις 70 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της GST στον τετρακέφαλο μυ κατά 150% στα πρόβατα που έλαβαν τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν το κοινό σιτηρέσιο (Διάγραμμα 36 (ii)).

5.5.3.2. Δραστικότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

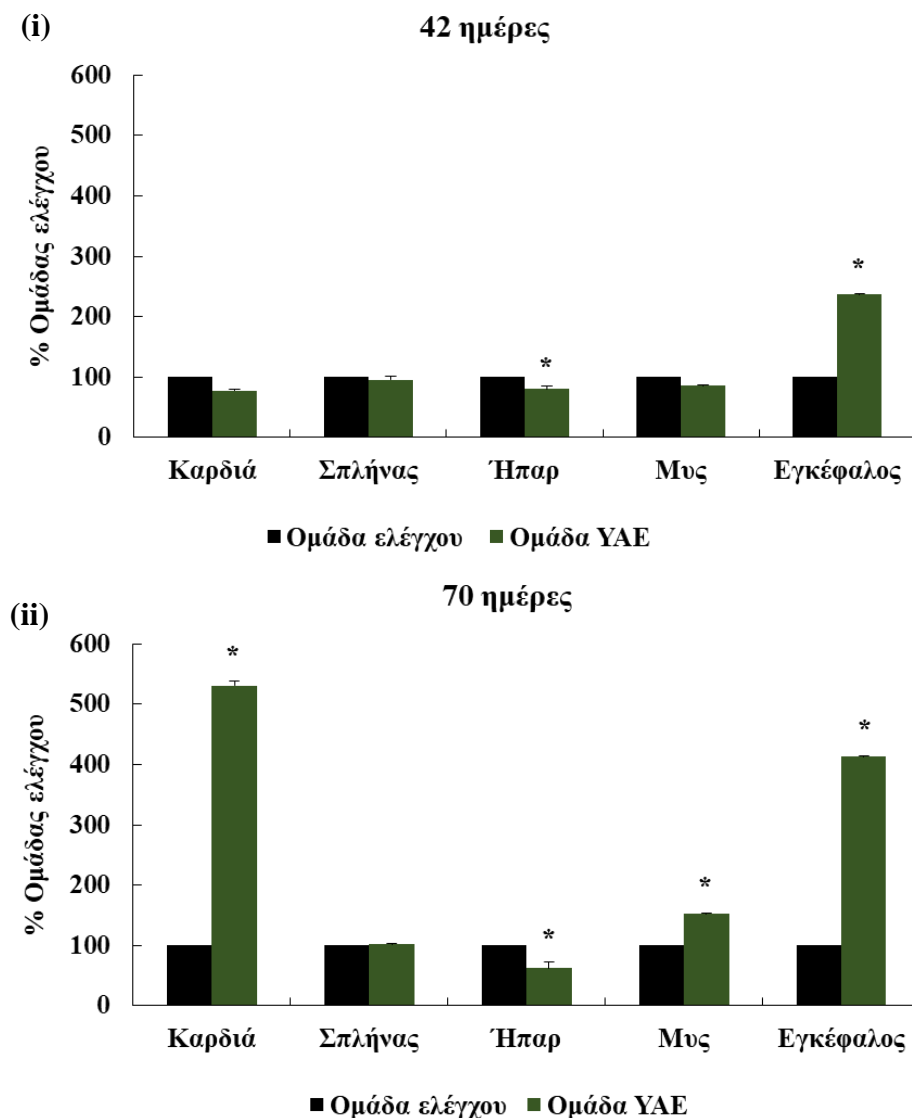




Διάγραμμα 37. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στη δραστικότητα της SOD σε ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο Διάγραμμα 37 απεικονίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τη δραστικότητα της SOD στους ιστούς των αμνών έπειτα από τη χορήγηση των δυο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ), κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες). Όπως φαίνεται και από τα δυο διαγράμματα, τα επίπεδα δραστικότητας της SOD δεν επηρεάστηκαν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (ελέγχου και ΥΑΕ) σε κανέναν από τους ιστούς που μελετήθηκαν και σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (Διάγραμμα 37 (i) & (ii)).

5.5.3.3. Πρωτεϊνική έκφραση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (γ-GCL)



Διάγραμμα 38. Επίδραση της χορήγησης των βιολειτουργικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ) στην πρωτεϊνική έκφραση της γ-GCL στους ιστούς των προβάτων (i) στις 42 και (ii) στις 70 ημέρες από τη γέννησή τους. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα ελέγχου. Σαν μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). *Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και ΥΑΕ, την ίδια χρονική στιγμή, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο διάγραμμα 38 φαίνονται τα αποτελέσματα από τους ιστούς των προβάτων στην πρωτεϊνική έκφραση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (γ-GCL), έπειτα από τη χορήγηση των δυο πειραματικών ζωοτροφών (ελέγχου και ΥΑΕ). Αναλυτικότερα, στις 42 ημέρες τα

επίπεδα έκφρασης της γ -GCL αυξήθηκαν σημαντικά μόνο στον ιστό του εγκεφάλου κατά 137.2%, ενώ στο ήπαρ μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 20% (Διάγραμμα 38 (i)). Στις 70 ημέρες η έκφραση της γ -GCL αυξήθηκε στην καρδιά, στον τετρακέφαλο μυ και στον εγκέφαλο κατά 430.8, 52.4 και 313.3% αντίστοιχα. Στο ήπαρ μειώθηκε επίσης κατά 37.5% (Διάγραμμα 38 (ii)).

Συγκεντρωτικά, όλα τα αποτελέσματα που αφορούν το οξειδοαναγωγικό προφίλ (δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, δραστικότητα και πρωτεϊνική έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων) των ιστών των προβάτων, απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19).

Πίνακας 19. Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης της ζωοτροφής με ΥΑΕ στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ιστών των προβάτων κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψιών (42 και 70 ημέρες)

Ιστοί Βιοδείκτες	ΚΑΡΔΙΑ		ΣΠΛΗΝΑΣ		ΗΠΑΡ		ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ		ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	
	42	70	42	70	42	70	42	70	42	70
GSH	↔	↑	↑	↑	↔	↔	↔	↑	↑	↑
γ-GCL	↔	↑	↔	↔	↓	↓	↔	↑	↑	↑
GST	↓	↑	↑	↔	↑	↔	↔	↑	↔	↔
SOD	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Αποικοδόμηση H₂O₂	↑	↑	↔	↔	↔	↑	↔	↑	↔	↔
TAC	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↑
TBARS	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↓
CARB	↓	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↓	↔	↔

Τα βέλη με φορά προς τα πάνω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική αύξηση. Τα βέλη με φορά προς τα κάτω υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική μείωση.

Τα αμφίδρομα βέλη υποδηλώνουν πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των δυο ομάδων την ίδια χρονική στιγμή.

5.5.4. Συζήτηση

Στο τελευταίο κομμάτι της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκαν οι αντιοξειδωτικές και πιθανές κλινικές επιδράσεις της ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, όταν αυτή χορηγήθηκε σε πρόβατα κατά τη διάρκεια των πρώτων 70 ημερών της ζωής τους. Σκοπός ήταν η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τη μέτρηση δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Επιπλέον με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western blot) εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της γ-γλουταμιλοκυστεΐνης (γ-GCL). Η γενική εικόνα της ζωοτροφής που ήταν εμπλουτισμένη με τα ΥΑΕ έδειξε ότι άσκησε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενισχύοντας το οξειδοαναγωγικό προφίλ των ζωτικών οργάνων των ιστών των προβάτων με ιστο-ειδικό τρόπο. Μηχανιστικά, φάνηκε ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι και ο ρυθμός ανακύκλωσης της γλουταθειόνης μπορεί να σχετίζεται εν μέρει στις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που περιέχονται στα ΥΑΕ, όπως φάνηκε από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στους ιστούς και αφορούσαν δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας (Πίνακας 17, Πίνακας 19) (46).

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, οι ιστοί της καρδιάς, του εγκεφάλου, του σπλήνα, του ήπατος και του τετρακέφαλου μυ που συλλέχθηκαν από τα 24 αρσενικά πρόβατα, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των επιδράσεων της εμπλουτισμένης με ΥΑΕ ζωοτροφής στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των προβάτων. Πραγματοποιήθηκαν δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, όπου στην πρώτη τα πρόβατα ήταν σε σχετικά νεαρή ηλικία (42 ημέρες από τη γέννησή τους) και οι αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί τους θεωρούνται ασθενείς, οπότε ήταν χρήσιμο να εξεταστεί πώς η τροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ επηρέασε τελικά αυτούς του μηχανισμούς και / ή τους προστάτευσε από οξειδωτικές βλάβες. Από την άλλη, τα πρόβατα στη δεύτερη χρονική στιγμή (70 ημέρες από τη γέννησή τους) είναι στην ηλικία της σφαγής τους για την κατανάλωση του κρέατος (46). Είναι σημαντικό λοιπόν να προσδιοριστεί και να μελετηθεί εν τω βάθει σε επίπεδο ιστών η οξειδοαναγωγική τους κατάσταση και στην ώριμη ηλικία τους, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες η ποιότητα και η γεύση του κρέατος επηρεάζεται σημαντικά (196,197).

Είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι οι παραπάνω ιστοί επιλέχθηκαν για συγκεκριμένους λόγους. Αρχικά, μελέτες αναφέρουν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών είναι υπεύθυνες για διάφορες παθολογίες στην καρδιά και προκαλούν φαινόμενα όπως της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (247,248). Οι Poou και συνεργάτες έχουν προτείνει μια θεωρία σύμφωνα με την οποία όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με βιομόρια, όπως λιπίδια και πρωτεΐνες, μπορούν να βλάψουν κυτταρικά οργανίδια, κυτταρικές μεμβράνες και ευθύνονται για δυσλειτουργίες που σχετίζονται με τη γήρανση του εγκεφάλου (249). Επίσης οι Dur-Zong και συνεργάτες αναφέρουν πως το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση διαφόρων μυϊκών δυσλειτουργιών, αφού ο σκελετικός μυς είναι ένα ευαίσθητο όργανο σε οξειδωτικές συνθήκες (250–252). Όπως έχει ήδη αναφερθεί έχει ιδιαίτερη σημασία να μελετηθεί και να εκτιμηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση του σε αυτό τον ιστό, αφού ο μυς αποτελεί βρώσιμο κομμάτι του ζώου για τη διατροφή των ανθρώπων και μελέτες έχουν δείξει ότι οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων αλλοιώνουν τη γεύση και τη θρεπτική αξία των προϊόντων κρέατος (151,200).

Επιπλέον, το ήπαρ αποτελεί ζωτικό όργανο, αφού διαθέτει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της αποτοξικοποίησης και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Είναι επίσης ένα από τα κύρια όργανα που προσβάλλονται από τις ROS. Συγκεκριμένα, τα παρεγχυματικά κύτταρα, τα κύτταρα Kupffer, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι δυνητικά περισσότερο ευαίσθητα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (253,254). Όταν η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι αυξημένη, διαταράσσεται η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση δημιουργώντας συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι οποίες παίζουν κρίσιμο ρόλο στις ηπατικές νόσους και χρόνιες εκφυλιστικές διαταραχές (95). Τέλος, ο σπλήνας είναι λεμφοειδές όργανο των ζώων και είναι το μεγαλύτερο του λεμφικού ιστού. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής αποτελεί βασικό αιμοποιητικό όργανο, δρα σαν φίλτρο καθαρισμού του αίματος από μη φυσιολογικά κύτταρά του, αντιγόνα και μικροοργανισμούς και παίζει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική και ειδική ανοσία (95,255). Για όλους, λοιπόν, τους προαναφερθέντες λόγους είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μελετηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση όλων αυτών των ζωτικών οργάνων και για την υγεία των ίδιων των ζώων.

Η εκτίμηση της δραστηριότητας της GST και της SOD, καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της γ-GCL είναι ιδιαίτερης σημασίας, αφού αποτελούν τους τρεις από τους πιο

σημαντικούς βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (95). Γενικά φάνηκε ότι η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου εμφάνισε την ωφέλιμη δράση της σε όλους τους μελετηθέντες ιστούς μέσω, εν μέρει, της γλουταθειόνης και του βιοσυνθετικού μονοπατιού της. Συγκεκριμένα, στον ιστό της καρδιάς, την 42^η ημέρα η δραστηριότητα της GST στην ομάδα ΥΑΕ μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της γ -GCL δεν επηρεάστηκαν. Από την άλλη, στις 70 ημέρες η δραστηριότητα και η πρωτεϊνική έκφραση των δυο αυτών ενζύμων αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα των αμνών με τη ζωοτροφή που περιείχε τα ΥΑΕ, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στον ιστό του τετρακέφαλου μυ, στις 42 ημέρες δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή ούτε στη GST, ούτε στη γ -GCL, ενώ στις 70 ημέρες η δραστηριότητα και η πρωτεϊνική έκφραση αυτών των ενζύμων αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα που έλαβε την εμπλουτισμένη ζωοτροφή, σε σχέση με την ομάδα που έλαβε ζωοτροφή εμπορίου. Επιπλέον, στον ιστό του εγκεφάλου η GST δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές μεταξύ των δυο ομάδων, ενώ τα επίπεδα της έκφρασης της γ -GCL στην ομάδα ΥΑΕ αυξήθηκαν σημαντικά και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση της γλουταθειόνης σε αυτούς τους ιστούς, στις 42 ημέρες τα επίπεδά της δεν επηρεάστηκαν σημαντικά στην καρδιά και στο μυ, ενώ αυξήθηκαν στον εγκέφαλο, ενώ αντίθετα στις 70 ημέρες η GSH αυξήθηκε σημαντικά και στους τρεις ιστούς, στην ομάδα ΥΑΕ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, πιθανόν εξ' αιτίας του γεγονότος ότι τα πρόβατα έλαβαν την πολυφαινολική ζωοτροφή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (55 ημέρες χορήγησης) (46). Δεδομένου ότι η GST χρησιμοποιεί-καταναλώνει τη GSH προκειμένου να απομακρύνει ξενοβιοτικές και ηλεκτροφιλικές ενώσεις, θεωρητικά θα αναμένονταν τα επίπεδά της να είναι μειωμένα. Αντίθετα, είτε δεν παρουσιάζουν κάποια μεταβολή, είτε αυξάνονται σημαντικά. Ένζυμα που συμμετέχουν στο ρυθμό ανακύκλωσης της GSH, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), ή η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι πιθανόν να ενεργοποιούνται και γι' αυτό το λόγο να μη παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της GSH παρόλο που η GST αυξήθηκε στις 42 ημέρες (46,95). Οι Masella και συνεργάτες έχουν αναφέρει ότι οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο, όπως η ελευρωπαΐνη, είναι υπεύθυνες για την αύξηση της δραστηριότητας της GR και GPx στα μακροφάγα (256). Οι Martin και συνεργάτες αναφέρουν ότι οι

πολυφαινόλες του ελαιολάδου, όπως η υδροξυτυροσόλη, αυξάνουν την δραστικότητα και την πρωτεϊνική έκφραση των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση της GSH, όπως είναι η GR, η GPx, η GST μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (257). Μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας από τους Kouka και συνεργατών, έχει επίσης δείξει ότι ελληνικά ελαιόλαδα με διαφορετική πολυφαινολική σύνθεση αυξάνουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές (258). Το γεγονός ότι η δραστικότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης δεν μεταβλήθηκε στον ιστό του εγκεφάλου σε καμία χρονική στιγμή πιθανόν να οφείλεται στη δραστικότητα άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, για χάρη κυτταρικής οικονομίας (95).

Από την άλλη, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της γ -GCL που παρατηρήθηκαν στις 70 ημέρες στην ομάδα YAE, μπορούν να εξηγηθούν από τα αυξημένα επίπεδα της γλουταθειόνης σε αυτούς τους ιστούς, αφού η γ -GCL αποτελεί το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι σύνθεσης της GSH. Η αυξημένη λοιπόν έκφραση της γ -GCL πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει στη *de novo* σύνθεση της γλουταθειόνης, προκειμένου να εξισορροπηθεί η πιθανή μείωσή της λόγω της αυξημένης δραστικότητας της GST. Πράγματι, η ερευνητική μας ομάδα σε προηγούμενες μελέτες έχει δείξει ότι οι ζωοτροφές που ήταν εμπλουτισμένες τόσο με υποπροϊόντα οινοποίησης, όσο και με προϊόντα ελαιοτριβείων, επηρέασαν τα επίπεδα αυτών των ενζύμων, σε πολλούς ιστούς και ενίσχυσαν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ζώων μέσω των αυξημένων επιπέδων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής (34,46,146,150,151,176,206).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των τριών ενζύμων στον ιστό του ήπατος, στις 42 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, η δραστηριότητα της GST αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα YAE σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα η πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL μειώθηκε σημαντικά και στις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες) στην ομάδα που έλαβε τη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με YAE συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε την κοινή ζωοτροφή. Δεδομένου ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο ήπαρ δεν μεταβλήθηκαν σε καμία χρονική στιγμή ανάμεσα στις ομάδες YAE και ελέγχου, αυτό πιθανόν να οφείλεται στη δραστικότητα διαφορετικών αντιοξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της GSH και μπορεί πιθανόν να ενεργοποιούνται από τις

πολυφαινολικές ενώσεις των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (95). Ένα ένζυμο που πιθανόν συμμετέχει και ενεργοποιεί αυτό το μηχανισμό μπορεί να είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οποία ανάγει τη GSSG σε GSH (95). Ταυτόχρονα, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα των δεικτών που σχετίζονται με την οξειδωτική καταστροφή στα λιπίδια (TBARS), στο ήπαρ μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (46). Αυτή η απόκριση μπορεί να αποδοθεί στην παρατηρούμενη αύξηση της GST, αφού πέραν της ικανότητάς της να καταλύει τη σύζευξη αντιοξειδωτικών μορίων με ξеноβιοτικά και να τα απομακρύνει, η GST εμφανίζει δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης καταλύοντας το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους (111,259).

Στο σπλήνα, στις 42 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, η χορήγηση της εμπλουτισμένης ζωοτροφής με ΥΑΕ οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα GST, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της γ -GCL δεν επηρεάστηκαν σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Επομένως θα περιμέναμε τα επίπεδα της γλουταθειόνης να είναι μειωμένα. Αντίθετα, από τις προηγούμενες μετρήσεις της GSH στο σπλήνα, τα επίπεδά της αυξήθηκαν σημαντικά και στις δυο δειγματοληψίες (Πίνακας 17). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η δραστηριότητα άλλων ενζύμων (π.χ. της GR), που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης μπορεί να ενισχυθεί από την πολυφαινολική ζωοτροφή με ΥΑΕ, συμβάλλοντας έτσι στην αναγέννησή της (95). Κατά τη δεύτερη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (70 ημέρες από τη γέννηση των αμνών), η ζωοτροφή με τα ΥΑΕ δεν επηρέασαν ούτε τη δραστηριότητα της GST, ούτε τα επίπεδα έκφρασης της γ -GCL, αν και η γλουταθειόνη ήταν αυξημένη. Παρομοίως και σε αυτή την περίπτωση η ενίσχυση άλλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών μπορεί να προστατέψει τη γλουταθειόνη από τη δράση των ελευθέρων ριζών (95).

Τέλος, εκτός από τα ένζυμα που σχετίζονται με το βιοσυνθετικό μονοπάτι της GSH (δηλ. GST, γ -GCL), προσδιορίστηκε και η δραστηριότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Σε κανέναν από τους ιστούς των προβάτων που εξετάστηκαν, τα επίπεδα της SOD δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ανάμεσα στις δυο ομάδες (ΥΑΕ και ελέγχου), σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας όπου και εκεί η SOD δεν επηρεάστηκε σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε ιστούς ήπατος και

σπλήνα αμνών, έπειτα από χορήγηση πολυφαινολών από υποπροϊόντα που προήλθαν από βιομηχανία παραγωγής κρασιού (95,177). Αντίθετα, οι Plesca και συνεργάτες σε μελέτη τους αναφέρουν ότι η γονιδιακή έκφραση της SOD ενισχύθηκε στον λιπώδη ιστό των Wistar αρουραίων όταν τους χορηγήθηκε τροφή εμπλουτισμένη με πρωτεΐνη σόγιας αντί για καζεΐνη (260).

Τα παραπάνω ευεργετικά αποτελέσματα της χορήγησης εμπλουτισμένης ζωοτροφής με ΥΑΕ στα ζωτικά όργανα των προβάτων οφείλονται βασικά στις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχουν. Η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα που παράγονται κατά την επεξεργασία της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου παρουσίασε διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τη ζωοτροφή του εμπορίου, όπως φάνηκε από τις *in vitro* τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν (46). Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν ήδη αναφέρει ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να ευθύνονται μερικώς για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων της φάσης I και II του μεταβολισμού, και ιδιαίτερα εκείνων των ενζύμων που σχετίζονται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης (241,261,262). Οι κύριες πολυφαινόλες των ΥΑΕ (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη) μπορούν επίσης να προκαλέσουν γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των GST και γ -GCL στα κύτταρα μέσω του μεταγραφικού μονοπατιού του Nrf2, ο οποίος αποτελεί σημαντικό μηχανισμό έναντι συνθηκών οξειδωτικού στρες (257,263). Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η πρωτεΐνη αποτελείται από δραστικά μόρια κυστεΐνης, τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν λόγω οξειδωτικών ερεθισμάτων και δράσης πολυφαινολών (264). Οι πολυφαινόλες μπορούν να οξειδώσουν ή να τροποποιήσουν τις θειολικές ομάδες της Keap1 με αποτέλεσμα, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 να χάνει τη σύνδεσή του με την πρωτεΐνη Keap1, να μετατοπίζεται στον πυρήνα και να ενεργοποιεί τα αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης (AREs), τα οποία ευθύνονται για την έκφραση σημαντικών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, όπως η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η γ -γλουταμινοκυστεΐνης (γ -GCL) (265,266). Επιπλέον, η δραστηριότητα της GST μπορεί να αυξηθεί σε ζώα μεγαλύτερης ηλικίας σαν αντισταθμιστικός μηχανισμός έναντι παραγόντων που προάγουν τη γήρανση (267,268).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η διατροφή, είναι ευρέως γνωστό ότι αποτελεί βασικό παράγοντα της ζωικής παραγωγής αφού δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων αλλά και το κόστος των ζωικών προϊόντων (34). Τα τελευταία χρόνια, φυσικές βιοδραστικές ενώσεις ενσωματώνονται στις ζωοτροφές προκειμένου να αναπτυχθούν βιολειτουργικά προϊόντα που θα βελτιστοποιήσουν την αποδοτικότητα, την παραγωγή και την ευζωία των ζώων (149). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών στα παραγωγικά ζώα μπορεί να βελτιώσει την ευημερία και την παραγωγικότητά τους (96,97). Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι βιοενεργές ενώσεις που υπάρχουν στα τρόφιμα διαθέτουν ιδιότητες που τους δίνουν τη δυνατότητα να προστατεύουν τους οργανισμούς από χρόνιες ασθένειες (143,147,148). Επιπλέον σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν μελέτες σε οικόσιτα ζώα, δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με την ευζωία τους. Πιο συγκεκριμένα, κοινές ασθένειες όπως πνευμονία, εντερίτιδα, και σηψαιμία σε χοίρους, προκαλούνται από διαταραχές στην αντιοξειδωτική ομοιόσταση (96,99–101). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ζώων, η καλή διαβίωση των ζώων είναι *«η σωματική και πνευματική κατάσταση ενός ζώου σε σχέση με τις συνθήκες στις οποίες ζει από την αρχή μέχρι το τέλος της ζωής τους»* (21), συνεπώς οι προαναφερόμενες καταστάσεις επηρεάζουν αρνητικά την παραγωγικότητα και την ευημερία τους (96,269). Επομένως, είναι προφανές ότι η συμπλήρωση και η χορήγηση της διατροφής τους με συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελέσει μια εναλλακτική και οικονομικά αποδοτική παρέμβαση για τη θεραπεία των ζώων από αυτές τις ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά τους συμπτώματα (34,95,96,182,270,271). Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι τα νεαρά παραγωγικά ζώα έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με εκείνα μεγαλύτερης ηλικίας, και έτσι είναι πιο απαραίτητο για τα πρώτα η χορήγηση εμπλουτισμένων ζωοτροφών προκειμένου να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική τους άμυνα για την προστασία τους από τέτοιες ασθένειες (182,183).

Το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας τόσο των κοτόπουλων όσο και των προβάτων κρεοπαραγωγής στη σύγχρονη εντατική εκτροφή τους. Θεωρείται, όπως προαναφέρθηκε, ως η αιτία αρκετών παθολογιών (π.χ. θερμική

καταπόνηση, απογαλακτισμός, διατροφικές ανισορροπίες και αναπνευστικές ασθένειες), οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξή τους (34,46,97,98). Αρκετά αντιοξειδωτικά έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση της τοξικότητας που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες στα ζώα (272). Επομένως, η εύρεση μεθόδων για την πρόληψη της παραγωγής των ελεύθερων ριζών και η θεραπεία του οξειδωτικού στρες είναι ένα σημαντικό ζήτημα για την κτηνοτροφία.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση της χορήγησης εμπλουτισμένων ζωοτροφών με υποπροϊόντα αγροτοβιομηχανιών, όπως τα στέμφυλα που παράγονται κατά τη διαδικασία της οινοποίησης και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, που παράγονται κατά τη διαδικασία επεξεργασίας της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου. Τα ζωικά είδη στα οποία χορηγήθηκαν οι παραπάνω ζωοτροφές ήταν νεαρά κοτόπουλα και πρόβατα κρεοπαραγωγής. Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στα δυο αυτά υποπροϊόντα παρατηρήθηκε ότι συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική άμυνα των ζώων αφού αυξάνουν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, ενισχύοντας παράλληλα το ανοσοποιητικό σύστημα (34,46).

Γενικά, οι πολυφαινόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα στα ζώα (273), αλλά στην παρούσα διατριβή αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι οι δυο εμπλουτισμένες ζωοτροφές (με στέμφυλα και ΥΑΕ) βελτίωσαν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κοτόπουλων και των αμνών, όπως φάνηκε από τους δείκτες που σχετίζονται με τη λιπιδική υπεροξείδωση και την οξείδωση των πρωτεϊνών, τόσο στο αίμα τους όσο και σε διάφορους ιστούς ζωικών τους οργάνων. Ιδιαίτερη μνεία γίνεται στο εύρημα της παρούσας διατριβής στο μυϊκό ιστό και των δυο ζωικών ειδών που εξετάστηκαν (κοτόπουλα και πρόβατα), όπου τα επίπεδα της οξείδωσης των λιπιδίων ήταν σημαντικά μειωμένα στις ομάδες που έλαβαν τις εμπλουτισμένες ζωοτροφές. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί αφ' ενός η οξείδωση των λιπιδίων αλλοιώνει σημαντικά την ποιότητα και τη γεύση του παραγόμενου κρέατος και αφ' ετέρου ο τετρακέφαλος μυς των συγκεκριμένων ζώων αποτελεί το κύριο βρώσιμο μέρος των ζώων. Συνεπώς, το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό αφού η μείωση της οξείδωσης λιπιδίων μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα και κατ' επέκταση να δώσει επιπλέον προστιθέμενη αξία στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα (196,197).

Επιπλέον, τόσο στο αίμα των κοτόπουλων και των προβάτων όσο και στους διάφορους ιστούς που μελετήθηκαν, τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η GSH φαίνεται να είναι ένας κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (34,46). Επιπροσθέτως, τα στέμφυλα και τα ΥΑΕ αύξησαν τη δραστηριότητα του ενζύμου της GST, ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση των ξενοβιοτικών από τον οργανισμό, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε και η πρωτεϊνική έκφραση της γ -GCL, του πρώτου βασικού ενζύμου που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της GSH. Αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα των στο αίμα και στα ζωτικά όργανα των κοτόπουλων και των αμνών, μπορούν πιθανόν να επιβεβαιωθούν και από την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα που είχαν οι δυο ζωοτροφές, όπως φάνηκε και από τη μέτρηση των *in vitro* τεχνικών, η οποία οφείλεται στις πολυφαινόλες που περιέχονται σε αυτές (144,153,274). Ωστόσο, αυτές οι θετικές επιδράσεις των ζωοτροφών φαίνεται να παρουσιάζουν μια σημαντική ιστο-ειδικότητα, που μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική φυσιολογία και απόκριση του κάθε ιστού στο οξειδωτικό στρες καθώς και της παρουσίας διαφορετικών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, σε κάθε έναν από τους μελετηθέντες ιστούς (46,151). Αυτά τα ευρήματα είναι σημαντικά καθώς, όπως προαναφέρθηκε, σε νεαρή ηλικία τα κοτόπουλα και τα πρόβατα είναι ευπαθή σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας (96,97).

Αξιοσημείωτο είναι ότι στη βιβλιογραφία υπάρχει έλλειψη δεδομένων, όσον αφορά την πολυπλοκότητα των διαφόρων ιστών σε όλους τους δείκτες που μελετήθηκαν. Επομένως, η καινοτομία της παρούσας διατριβής έγκειται στο γεγονός ότι είναι η πρώτη που μελετά την επίδραση των υποπροϊόντων οινοποίησης και ελαιολιπιδίων, τόσο σε πλήθος ιστών, όσο και σε πλήθος δεικτών που σχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό προφίλ του κάθε ιστού ξεχωριστά. Είναι επίσης σημαντικό ότι στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποδείχθηκε λεπτομερώς ότι οι δυο βιολειτουργικές ζωοτροφές (στεμφύλων και ΥΑΕ) είχαν θετική επίδραση σε σημαντικά ζωτικά όργανα των δυο μελετηθέντων ειδών (π.χ. καρδιά, ήπαρ, σπλήνας, νεφρός, εγκέφαλος, πάγκρεας κλπ.), αφού τα προστάτεψαν από την οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων, αυξάνοντας αφ' ενός τα επίπεδα της GSH, του πιο κρίσιμου αντιοξειδωτικού μορίου και αφ' ετέρου τη δραστηριότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, σε αρκετούς από τους ιστούς που εξετάστηκαν. Η

εκμετάλλευση λοιπόν τόσο των στεμφύλων όσο και των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου με σκοπό την παρασκευή ζωοτροφών με αποδεδειγμένες αντιοξειδωτικές ικανότητες μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και οικονομικά αποδοτική παρέμβαση για τη θεραπεία παθολογικών καταστάσεων σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες, προκειμένου να ενισχυθεί η παραγωγικότητα και να βελτιωθεί η ευζωία των παραγωγικών ζώων.

Τέλος, είναι γνωστό ότι και τα στέμφυλα και τα ΥΑΕ αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους, εξαιτίας του υψηλού τους οργανικού φορτίου και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν περιβαλλοντικά φιλικές μέθοδοι για την επεξεργασία και διαχείρισή τους. Επομένως η αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων στην παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών, μπορεί να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό τρόπο προστασίας του περιβάλλοντος, αφού η ανεξέλεγκτη εναπόθεσή τους σε αυτό μπορεί να επιβαρύνει την ποιότητα τόσο των υδάτινων οικοσυστημάτων στα οποία απορρίπτονται, όσο και των γειτονικών τους. Μελλοντικά, αφού παρατηρήθηκε έντονη ιστο-ειδικότητα των αποτελεσμάτων, θα ήταν σκόπιμο να εξεταστεί η δραστηριότητα επιπλέον αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως αυτών που συμμετέχουν στο ρυθμό ανακύκλωσης της γλουταθειόνης, καθώς και επίπεδα πρωτεϊνικής και γονιδιακής έκφρασης αντιοξειδωτικών μορίων, ώστε να διαμορφωθεί μια πιο πλήρης εικόνα για το οξειδοαναγωγικό προφίλ του κάθε ιστού των ζώων ξεχωριστά. Θα ήταν ιδιαίτερος σημαντικό τα παρόντα αποτελέσματα να εξεταστούν για την επίδραση των βιολειτουργικών ζωοτροφών με βάση την πάροδο του χρόνου, για να διευκρινιστεί αν οι ζωοτροφές έχουν θετική επίδραση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, ή αν εμφανίζεται τοξικότητα. Επιπλέον, θα ήταν αξιοσημείωτη μια συσχέτιση ανάμεσα στους μετρηθέντες δείκτες, ώστε να μελετηθεί ποιοί δείκτες σχετίζονται μεταξύ τους στα δυο πειραματικά πρωτόκολλα (στεμφύλων και ΥΑΕ), σχηματίζοντας μικρά δίκτυα μηχανιστικής δράσης. Τέλος, γνωρίζοντας ότι στα φυτικά είδη το πολυφαινολικό προφίλ μπορεί να ποικίλει από έτος σε έτος καλλιέργειας, πιθανόν να είναι σκόπιμη η διερεύνηση της επίδρασης και αυτού του παράγοντα στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εμπλουτισμένων ζωοτροφών και κατ' επέκταση στα αποτελέσματα όλων των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ζωικών ειδών.

Βιβλιογραφία

1. This P, Lacombe T, Thomas MR. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* 2006 Sep;22(9):511–9.
2. McGovern PE. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture.* 2003. 58–59 p.
3. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci.* 2010 Feb;11(2):622–46.
4. Jackson RS. 12 - Wine and Health. In: Jackson RSBT-WS (Third E, editor. *Food Science and Technology.* San Diego: Academic Press; 2008. p. 686–706.
5. Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2009/07/22. 2009 Sep;139(9):1788S-93S.
6. Rasines-Perea Z, Teissedre P-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules.* 2017 Jan;22(1).
7. Vislocky LM, Fernandez ML. Biomedical effects of grape products. *Nutr Rev.* 2010 Nov;68(11):656–70.
8. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr.* 2000 Jan;130(1):53–6.
9. Shen C-L, von Bergen V, Chyu M-C, Jenkins MR, Mo H, Chen C-H, et al. Fruits and dietary phytochemicals in bone protection. *Nutr Res.* 2012 Dec;32(12):897–910.
10. Bagchi D, Das DK, Tosaki A, Bagchi M, Kothari SC. Benefits of resveratrol in women's health. *Drugs Exp Clin Res.* 2001;27(5–6):233–48.
11. Chacon MR, Ceperuelo-Mallafre V, Maymo-Masip E, Mateo-Sanz JM, Arola L, Guitierrez C, et al. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine.* 2009 Aug;47(2):137–42.
12. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem.* 2009 Mar;20(3):210–8.
13. Jung HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, et al. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch Pharm Res.* 2005 May;28(5):557–

- 60.
14. Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2006 Aug 1;41(7):799–804.
 15. Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA V, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a *vinifera* grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*. 2002 Nov;54(11):1515–20.
 16. Kaur M, Agarwal C, Agarwal R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *J Nutr*. 2009 Sep;139(9):1806S-12S.
 17. Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett*. 2018 Jan;413:122–34.
 18. Xia N, Daiber A, Forstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(12):1633–46.
 19. Moore A, Beidler J, Hong MY. Resveratrol and Depression in Animal Models: A Systematic Review of the Biological Mechanisms. *Molecules*. 2018 Aug 30;23(9):2197.
 20. Ge J-F, Peng L, Cheng J-Q, Pan C-X, Tang J, Chen F-H, et al. Antidepressant-like effect of resveratrol: involvement of antioxidant effect and peripheral regulation on HPA axis. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Dec;114–115:64–9.
 21. Liu S, Li T, Liu H, Wang X, Bo S, Xie Y, et al. Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 2016 Apr;302:191–9.
 22. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing K V, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997 Jan;275(5297):218–20.
 23. Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9.

- Cancer Res. 2002 Sep;62(17):4945–54.
24. Singh B, Shoulson R, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat NK, Dim DC, et al. Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways. *Carcinogenesis*. 2014 Aug;35(8):1872–80.
 25. Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2010 Feb;36(1):43–53.
 26. Li ZG, Hong T, Shimada Y, Komoto I, Kawabe A, Ding Y, et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. *Carcinogenesis*. 2002 Sep;23(9):1531–6.
 27. Sengottuvelan M, Nalini N. Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. *Br J Nutr*. 2006 Jul;96(1):145–53.
 28. Tessitore L, Davit A, Sarotto I, Caderni G. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. *Carcinogenesis*. 2000 Aug;21(8):1619–22.
 29. Levi F, Pasche C, Lucchini F, Ghidoni R, Ferraroni M, La Vecchia C. Resveratrol and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev*. 2005 Apr;14(2):139–42.
 30. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Mar;294(3):L478-88.
 31. Baiano A, Scrocco C, Sepielli G, Del Nobile MA. Wine Processing: A Critical Review of Physical, Chemical, and Sensory Implications of Innovative Vinification Procedures. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Oct;56(14):2391–407.
 32. Mossa A-TH, Ibrahim FM, Mohafrash SMM, Abou Baker DH, El Gengaihi S. Protective Effect of Ethanolic Extract of Grape Pomace against the Adverse Effects of Cypermethrin on Weanling Female Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 Jul 22;2015:381919.
 33. Souad El Gengaihi, Ella FMA, Hassan EM, Shalaby EA, Baker DHA. Phytochemical Investigation and Radical Scavenging Activity of Wastes of Some

- Grape Varieties Grown in Egypt. *Glob J Pharmacol*. 2013;7:465–73.
34. Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T, Petrotos K, Gerasopoulos K, et al. Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food Chem Toxicol*. 2017 Jan;102:24–31.
 35. Goni I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebole A, et al. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult Sci*. 2007 Mar;86(3):508–16.
 36. Jackson RS. 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine. In: Jackson RSBT-WS (Third E, editor. *Food Science and Technology*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 270–331.
 37. Amico V, Napoli EM, Renda A, Ruberto G, Spatafora C, Tringali C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chem*. 2004 Dec;88(4):599–607.
 38. Ju Z, Howard LR. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J Food Sci*. 2005;70(4):S270--S276.
 39. Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R. A Novel Process for the Recovery of Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace. *J Food Sci*. 2005;70(2):C157--C163.
 40. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng*. 2007 Jul;81(1):200–8.
 41. Alonso AM, Guillen DA, Barroso CG, Puertas B, Garcia A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct;50(21):5832–6.
 42. Anđelković M, Radovanović B, Milenković Anđelković A, Radovanović V, Zarubica A, Stojković N, et al. The determination of bioactive ingredients of grape pomace (Vranac variety) for potential use in food and pharmaceutical industries. *Adv Technol*. 2015;4(2):32–6.

43. Michailides M. Biological treatment of olive oil mill wastewater. Ioannina; 2011.
44. AZBAR N, BAYRAM A, FILIBELI A, MUEZZINOGLU A, SENGUL F, OZER A. A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2004 May 1;34(3):209–47.
45. IPPC Directive, Council Directive 96/61/EC of 24 September 1996 concerning integrated pollution prevention and control. *Official Journal L 257*. 1996.
46. Makri S, Kafantaris I, Savva S, Ntanou P, Stagos D, Argyroulis I, et al. Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs. *In Vivo*. 2018;32(2):291–302.
47. Michailides M, Panagopoulos P, Akratos CS, Tekerlekopoulou AG, Vayenas D V. A full-scale system for aerobic biological treatment of olive mill wastewater. *J Chem Technol Biotechnol*. 2011;86(6):888–92.
48. Terral J-F, Alonso N, Capdevila RB i, Chatti N, Fabre L, Fiorentino G, et al. Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material. *J Biogeogr*. 2004 Jan 1;31(1):63–77.
49. Loukas M, Krimbas CB. History of olive cultivars based on their genetic distances. *J Hortic Sci*. 1983 Jan 1;58(1):121–7.
50. Fiestas Ros de Ursinos JA, Borja Padilla R. Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*; Vol 43, No 2. 1992;
51. Borja R, Rincón B, Raposo F. Anaerobic biodegradation of two-phase olive mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006 Sep 1;81(9):1450–62.
52. Paraskeva P, Diamadopoulos E. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006;81(9):1475–85.
53. Pelendridou K, Michailides MK, Zagklis DP, Tekerlekopoulou AG, Paraskeva CA, Vayenas D V. Treatment of olive mill wastewater using a coagulation-flocculation process either as a single step or as post-treatment after aerobic biological treatment. *J Chem Technol Biotechnol*. 2014;89(12):1866–74.
54. Adhoum N, Monser L. Decolourization and removal of phenolic compounds from

- olive mill wastewater by electrocoagulation. *Chem Eng Process Process Intensif.* 2004 Oct;43(10):1281–7.
55. Rinaldi M, Rana G, Introna M. Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *F Crop Res.* 2003 Dec;84(3):319–26.
 56. Dordio A, Carvalho AJP. Constructed wetlands with light expanded clay aggregates for agricultural wastewater treatment. *Sci Total Environ.* 2013 Oct 1;463–464:454–61.
 57. Zagklis DP, Arvaniti EC, Papadakis VG, Paraskeva CA. Sustainability analysis and benchmarking of olive mill wastewater treatment methods. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013;88(5):742–50.
 58. Karahan Ozgun O, Pala Ozkok I, Kutay C, Orhon D. Characteristics and biodegradability of olive mill wastewaters. *Environ Technol.* 2016;37(10):1240–8.
 59. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1321–42.
 60. Greco G, Toscano G, Cioffi M, Gianfreda L, Sannino F. Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water Res.* 1999;33(13):3046–50.
 61. Azbar N, Keskin T, Catalkaya EC. Improvement in anaerobic degradation of olive mill effluent (OME) by chemical pretreatment using batch systems. *Biochem Eng J.* 2008;38(3):379–83.
 62. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989 Dec;82(12):747–52.
 63. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 1999;13(3):295–309.
 64. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988 Mar;5(3):156–70.
 65. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Mar;33(3):368–70.
 66. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radical Biology and Medicine.* 2015.
 67. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18(10):872–9.

68. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994 Aug;52(8 Pt 1):253–65.
69. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):481–93.
70. Steinbacher P, Eckl P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules.* 2015;5(2):356–77.
71. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul 1;4(8):118–26.
72. Li X, Hao S, Han A, Yang Y, Fang G, Liu J, et al. Intracellular Fenton reaction based on mitochondria-targeted copper(ii)–peptide complex for induced apoptosis. *J Mater Chem B.* 2019;7(25):4008–16.
73. von Sonntag C. The Chemistry of Free-Radical-Mediated DNA Damage. In: Glass W, Varma M, editors. *Physical and Chemical Mechanisms in Molecular Radiation Biology SE - 10.* Springer US; 1991. p. 287–321. (Basic Life Sciences; vol. 58).
74. Bielski BJ, Cabelli D. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. In: Foote C, Valentine J, Greenberg A, Liebman J, editors. *Active Oxygen in Chemistry SE - 3.* Springer Netherlands; 1995. p. 66–104. (Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (SEARCH Series); vol. 2).
75. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jan;30(1):11–26.
76. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527–605.
77. Kuppasamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem.* 1989 Jun;264(17):9880–4.
78. Choi E-Y, Stockert AL, Leimkühler S, Hille R, Choi E-Y, Stockert AL, et al. Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J Inorg Biochem.* 2004;98:841–8.
79. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. Vol. 275, *FEBS Journal.* 2008. p. 3278–89.

80. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium: Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4985–94.
81. Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.* 2008 Aug;130(2):281–97.
82. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA; 2015.
83. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453–62.
84. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016 Mar;148:183–93.
85. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev.* 2013 Jan;12(1):376–90.
86. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol.* 2013;231:290–300.
87. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Neuromolecular Med.* 2014 Jun;16(2):217–30.
88. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* 2018 Aug;124:420–30.
89. Halliwell B. *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease.* In: eLS . John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
90. Orrenius S. Mechanisms of Oxidative Cell Damage BT - Free Radicals: from Basic Science to Medicine. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. Basel: Birkhäuser Basel; 1993. p. 47–64.
91. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jul;33(1):29–36.
92. Renke J, Popadiuk S, Korzon M, Bugajczyk B, Wozniak M. Protein carbonyl groups’ content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in

- plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jul;29(2):101–4.
93. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002 May;32(9):790–6.
 94. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun;86:715–48.
 95. Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, Kafantaris I, Makri S, Stagos D, et al. Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Reports.* 2017;4:364–72.
 96. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007 May;173(3):502–11.
 97. Skaperda Z, Veskoukis AS, Kouretas D. Farm animal welfare, productivity and meat quality: Interrelation with redox status regulation and antioxidant supplementation as a nutritional intervention (Review)le. *World Acad Sci J.* 2019;1(4):177–83.
 98. Avanzo JL, de Mendonca CXJ, Pugine SM, de Cerqueira Cesar M. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001 Jun;129(2):163–73.
 99. Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Friis C. Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Res Vet Sci.* 2003 Jun;74(3):271–7.
 100. Miller J, Brzezinska-Slebozinska E, Madsen F. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science.* 1993 Sep;76(9):2812–23.
 101. Basu S, Eriksson M. Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Ann Acad Med Singapore.* 2001 May;30(3):265–9.
 102. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation.* 2015.
 103. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions.* 2006 Mar;160(1):1–40.
 104. Marcocci C, Leo M, Altea MA. Oxidative stress in graves' disease. *Eur Thyroid J.* 2012/06/07. 2012 Jul;1(2):80–7.

105. SIES H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 1993.
106. Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med*. 2015;
107. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 May;11(4):341–6.
108. Sea K, Sohn SH, Durazo A, Sheng Y, Shaw BF, Cao X, et al. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2015;290(4):2405–18.
109. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 2000;296(1):295–309.
110. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(5):3217–66.
111. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45(1):51–88.
112. Josephy PD. Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology. *Hum Genomics Proteomics*. 2010;2010:1–14.
113. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):86–98.
114. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(5):3143–53.
115. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2012;2(December):1–13.
116. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1–Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013;
117. Suzuki M, Otsuki A, Keleku-Lukwete N, Yamamoto M. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr Opin Toxicol*. 2016;1:29–36.
118. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1

- represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76–86.
119. Buettner GR. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1993.
 120. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004 Mar;134(3):489–92.
 121. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. Vol. 5 AUG, *Frontiers in Pharmacology.* 2014.
 122. Kumar AN. Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant \blacklozenge an uncertainty. Aruna P, editor. *Arch Med Rev J.* 2015;24(1):19–40.
 123. Lattanzio VMTVVMTV, Lattanzio VMTVVMTV, Cardinali A, Amendola V. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Vol. 661, *Phytochemistry.* 2006. 23–67 p.
 124. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods.* 2015.
 125. Crozier A, Clifford MN. Terpenes, Plant Secondary Metabolites. *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* 2006.
 126. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* 2002.
 127. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010 Dec;2(12):1231–46.
 128. Landete JM. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(7):706–21.
 129. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
 130. Landete JM. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(10):936–48.
 131. Galinski CN, Zwicker JI, Kennedy DR. Revisiting the mechanistic basis of the

- French Paradox: Red wine inhibits the activity of protein disulfide isomerase in vitro. *Thromb Res.* 2016;
132. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001.
 133. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* 2015.
 134. Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. Dietary lignans: Physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews.* 2010;
 135. Sies H. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010.
 136. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008 Aug;476(2):107–12.
 137. Visioli F. Xenobiotics and human health: A new view of their pharma-nutritional role. *PharmaNutrition.* 2015;3(2):60–4.
 138. Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry.* 2011.
 139. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Sep;501(1):65–72.
 140. Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, et al. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: Far beyond their antioxidant properties. Vol. 824, *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2014. p. 141–59.
 141. Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Topham DKW. *Phytochemicals as bioactive agents.* CRC press; 2000.
 142. Meskin MS, Davies AJ, Bidlack WR, Omaye ST. *Phytochemicals in nutrition and health.* CRC Press; 2002.
 143. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular

- disease and cancer. *Am J Med.* 2002 Dec;113 Suppl:71S-88S.
144. Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sanchez J, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2013 Jun;61(22):5179–88.
 145. Knupp G, Rücker G, Ramos-Cormenzana A, Garrido Hoyos S, Neugebauer M, Ossenkop T. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1996;38(3):277–82.
 146. Gerasopoulos K, Stagos D, Kokkas S, Petrotos K, Kantas D, Goulas P, et al. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem Toxicol.* 2015 Aug;82:42–9.
 147. Banjari I, Misir A, Savikin K, Jokic S, Molnar M, De Zoysa HKS, et al. Antidiabetic Effects of Aronia melanocarpa and Its Other Therapeutic Properties. *Front Nutr.* 2017;4:53.
 148. Gouvinhas I, Machado N, Sobreira C, Dominguez-Perles R, Gomes S, Rosa E, et al. Critical Review on the Significance of Olive Phytochemicals in Plant Physiology and Human Health. *Molecules.* 2017 Nov;22(11).
 149. Pinotti L, Krogdahl A, Givens I, Knight C, Baldi A, Baeten V, et al. The role of animal nutrition in designing optimal foods of animal origin as reviewed by the COST Action Feed for Health (FA0802). *Biotechnol Agron Société Environ.* 2014;18(4):471–9.
 150. Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Kokkas S, Kantas D, Goulas P, et al. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol.* 2015 Dec;86:319–27.
 151. Kafantaris I, Stagos D, Kotsampasi B, Hatzis A, Kypriotakis A, Gerasopoulos K, et al. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal.* 2017 Jul;12(2):1–10.
 152. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25–30.

153. Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, et al. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol.* 2013 Nov;61:60–8.
154. Cano A. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal.* 1998;9(4):196–202.
155. Reddy YN, Murthy S V, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004;51:213–8.
156. Halliwell B, Clement M V, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000 Dec;486(1):10–3.
157. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–6.
158. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62(3):231–6.
159. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2001 May;28(2):141–3.
160. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.* 2004 Mar;357(2):83–6.
161. Udomsinprasert R, Pongjaroenkit S, Wongsantichon J, Oakley AJ, Prapanthadara L, Wilce MCJ, et al. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem J.* 2005 Jun;388(Pt 3):763–71.
162. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov;360(Pt 1):1–16.
163. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1985;57:357–417.
164. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1969;32:173–

- 219.
165. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974 Nov;249(22):7130–9.
 166. Veskoukis A, Kerasioti E, Priftis A, Kouka P, Spanidis Y, Makri S, et al. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Curr Opin Toxicol.* 2019;13.
 167. Veskoukis AS, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem.* 2016;21(3):208–17.
 168. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010 Jan;5(1):51–66.
 169. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984;105:457–64.
 170. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350–4.
 171. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat.* 2011 Mar 1;10(2):128–34.
 172. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC(50) concept revisited. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(11):1282–90.
 173. Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(11):579–90.
 174. Guaita M, Bosso A. Polyphenolic Characterization of Grape Skins and Seeds of Four Italian Red Cultivars at Harvest and after Fermentative Maceration. *Foods (Basel, Switzerland).* 2019 Sep;8(9).
 175. Brezoiu A-M, Matei C, Deaconu M, Stanciuc A-M, Trifan A, Gaspar-Pintiliescu A, et al. Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. *Food Chem Toxicol.*

- 2019 Aug;133:110787.
176. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, et al. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2016 Oct;101(5).
 177. Goutzourelas N, Stagos D, Housmekeridou A, Karapoulou C, Kerasioti E, Aligiannis N, et al. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2015 Aug;36(2):433–41.
 178. Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, et al. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5846–56.
 179. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, et al. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec;50(26):7548–55.
 180. Yan L, Kim IH. Effect of Dietary Grape Pomace Fermented by *Saccharomyces boulardii* on the Growth Performance, Nutrient Digestibility and Meat Quality in Finishing Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2011 Dec 24;24(12):1763–70.
 181. Abu Hafsa SH, Ibrahim SA. Effect of dietary polyphenol-rich grape seed on growth performance, antioxidant capacity and ileal microflora in broiler chicks. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018 Feb;102(1):268–75.
 182. Chan JKW, Charrier JG, Kodani SD, Vogel CF, Kado SY, Anderson DS, et al. Combustion-derived flame generated ultrafine soot generates reactive oxygen species and activates Nrf2 antioxidants differently in neonatal and adult rat lungs. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:34.
 183. Jain A, Flora SJS. Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J Environ Biol*. 2012 Mar;33(2):233–8.
 184. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014;5:196.
 185. Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, et al. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and

- endothelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 2014 Nov;33(11):1099–112.
186. Kumar H, Kim I-S, More SV, Kim B-W, Choi D-K. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep*. 2014 Jan;31(1):109–39.
 187. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9–10):1865–79.
 188. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C849-68.
 189. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*. 1986 Jan;77(1):319–21.
 190. Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med*. 1991 Jul;118(1):7–16.
 191. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1–85.
 192. Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact*. 2009 Aug;180(3):421–32.
 193. Brenes A, Viveros A, Goni I, Centeno C, Sayago-Ayerdy SG, Arija I, et al. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poult Sci*. 2008 Feb;87(2):307–16.
 194. Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci*. 2011 Mar;90(3):566–78.
 195. Sáyago-Ayerdi SG, Brenes A, Viveros A, Goñi I. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Sci*. 2009 Nov;83(3):528–33.
 196. Arshad MS, Anjum FM, Khan MI, Shahid M, Akhtar S, Sohaib M. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids Health Dis*. 2013;12(1):164.
 197. Nam KC, Ahn DU. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor

- volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Sci.* 2003 Jan;63(1):1–8.
198. Starcevic K, Krstulovic L, Brozic D, Mauric M, Stojevic Z, Mikulec Z, et al. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *J Sci Food Agric.* 2015 Apr;95(6):1172–8.
199. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3–4):207–18.
200. Zhang W, Xiao S, Ahn DU. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(11):1191–201.
201. Payne RL, Southern LL. Changes in glutathione peroxidase and tissue selenium concentrations of broilers after consuming a diet adequate in selenium. *Poult Sci.* 2005 Aug;84(8):1268–76.
202. Visioli F, Wolfram R, Richard D, Abdullah MICB, Crea R. Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2009 Mar;57(5):1793–6.
203. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2011 Jul 17;2011:809696.
204. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
205. El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chem.* 2012 May 1;132(1):406–12.
206. Papadopoulou A, Petrotos K, Stagos D, Gerasopoulos K, Maimaris A, Makris H, et al. Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017. 1–10 p.
207. Fki I, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem.* 2007 Feb;55(3):624–31.
208. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulilian B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain

- injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *ScientificWorldJournal*. 2010 Jun 29;10:1180–91.
209. Qosa H, Batarseh YS, Mohyeldin MM, El Sayed KA, Keller JN, Kaddoumi A. Oleocanthal Enhances Amyloid- β Clearance from the Brains of TgSwDI Mice and in Vitro across a Human Blood-Brain Barrier Model. *ACS Chem Neurosci*. 2015 Nov 18;6(11):1849–59.
 210. Kotsiou A, Tesseromatis C. Oleocanthal an extra-virgin olive oil bioactive component. *J Med Plants Stud*. 2017;5(3):95–100.
 211. Martorell M, Forman K, Castro N, Capo X, Tejada S, Sureda A. Potential Therapeutic Effects of Oleuropein Aglycone in Alzheimer’s Disease. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(11):994–1001.
 212. Metcalfe NB, Alonso-Alvarez C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Funct Ecol*. 2010;24(5):984–96.
 213. Nussey DH, Pemberton JM, Pilkington JG, Blount JD. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct Ecol*. 2009;23(4):809–17.
 214. Saibandith B, Spencer JPE, Rowland IR, Commane DM. Olive Polyphenols and the Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2017 Jun;22(7).
 215. Rubio-Senent F, de Roos B, Duthie G, Fernandez-Bolanos J, Rodriguez-Gutierrez G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur J Nutr*. 2015 Dec;54(8):1287–95.
 216. Gerasopoulos K, Stagos D, Krouzas A, Karaveli C, Barda C, Gkika H, et al. Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater. *In Vivo*. 2016;30(3):291–301.
 217. Qi KK, Chen JL, Zhao GP, Zheng MQ, Wen J. Effect of dietary omega6/omega3 on growth performance, carcass traits, meat quality and fatty acid profiles of Beijing-you chicken. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2010 Aug;94(4):474–85.
 218. Gessner DK, Ringseis R, Eder K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative

- stress and inflammatory processes in farm animals. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017 Aug;101(4):605–28.
219. Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem*. 2013;48(10):1532–52.
 220. Xu Y, Burton S, Kim C, Sismour E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Sci Nutr*. 2016 Jan;4(1):125–33.
 221. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;289(3):361–70.
 222. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Dec;33(12):656–68.
 223. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev*. 2005;4(2):288–314.
 224. Alía M, Horcajo C, Bravo L, Goya L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res*. 2003;23(9):1251–67.
 225. Zhang X-H, Choi S-K, Seo J-S. Effect of Dietary Grape Pomace on Lipid Oxidation and Related Enzyme Activities in Rats Fed High Fat Diet. *Korean J Nutr*. 2009 Jul;42(5):415–22.
 226. Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni M V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *J Funct Foods*. 2016;20:332–45.
 227. Fernandez-Pachon MS, Berna G, Otaolaurruchi E, Troncoso AM, Martin F, Garcia-Parrilla MC. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug;57(15):6578–83.
 228. Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M, Sandstrom B. The effect of grape-skin extract on oxidative status. *Br J Nutr*. 2000 Oct;84(4):505–13.
 229. Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, et

- al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr.* 1999 Jan;69(1):87–94.
230. Puiggròs F, Llópiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Grape Seed Procyanidins Prevent Oxidative Injury by Modulating the Expression of Antioxidant Enzyme Systems. *J Agric Food Chem.* 2005 Jul 1;53(15):6080–6.
231. Choi C-S, Chung H-K, Choi M-K, Kang M-H. Effects of grape pomace on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Nutr Res Pract.* 2010 Apr;4(2):114–20.
232. Singha I, Das SK. Scavenging and antioxidant properties of different grape cultivars against ionizing radiation-induced liver damage *ex vivo*. *Indian J Exp Biol.* 2016 Apr;54(4):280–5.
233. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull.* 2003 Oct;26(10):1398–402.
234. Tsai C-F, Hsu Y-W, Ting H-C, Huang C-F, Yen C-C. The *in vivo* antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Food Chem.* 2013 Feb;136(3–4):1337–44.
235. Skrzydlewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michalak K. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine.* 2002 Apr;9(3):232–8.
236. Carlioz A, Touati D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* 1986;5(3):623–30.
237. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1986;58:61–97.
238. Priftis A, Goutzourelas N, Halabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Amoutzias GD, et al. Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev.* 2018 Jun;172:115–22.
239. Priftis A, Soursou V, Makiou A-S, Tekos F, Veskoukis AS, Tsantarliotou MP, et al. A lightly roasted coffee extract improves blood and tissue redox status in rats through enhancement of GSH biosynthesis. *Food Chem Toxicol.* 2019 Mar;125:305–12.

240. Baillet A, Chanteperdrix V, Trocme C, Casez P, Garrel C, Besson G. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010 Oct;35(10):1530–7.
241. Boone CW, Kelloff GJ, Steele VE, Sharma S, Zhu S, Mehta R, et al. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis.* 2000 Jan 1;21(1):63–7.
242. Yousef MI, Omar SAM, El-Guendi MI, Abdelmegid LA. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol.* 2010 Nov;48(11):3246–61.
243. Al-Enazi MM. Combined therapy of rutin and silymarin has more protective effects on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *J Appl Pharm Sci.* 2014;4(1):21.
244. PALANIVEL GM, RAJKAPOOR B, KUMAR SR, EINSTEIN WJ, KUMAR PE, KUMAR RM, et al. Hepatoprotective and Antioxidant Effect of *Pisonia aculeata* L. against CCl₄-Induced Hepatic Damage in Rats. Vol. 76, *Scientia Pharmaceutica* . 2008.
245. Maliakal PP, Coville PF, Wanwimolruk S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Apr;53(4):569–77.
246. Sadi G, Baloglu MC, Pektas MB. Differential gene expression in liver tissues of streptozotocin-induced diabetic rats in response to resveratrol treatment. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124968.
247. Kobayashi A, Watanabe H, Ozawa K, Hayashi H, Yamazaki N. Oxygen-derived free radicals related injury in the heart during ischemia and reperfusion. *Jpn Circ J.* 1989 Sep;53(9):1122–31.
248. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1993 Oct;30(2):55–67.
249. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* 2004;20(2):329–59.
250. Hsu D-Z, Chu P-Y, Wu P-T, Shen P-C, Jou I-M. Oxidative stress participates in quadriceps muscle dysfunction during the initiation of osteoarthritis in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Oct 1;8(10):12491–9.

251. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab*. 2008 Dec;33(6):1140–54.
252. Veskoukis AS, Margaritelis N V, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Rep*. 2018 Dec;23(1):47–56.
253. Kouka P, Priftis A, Stagos D, Angelis A, Stathopoulos P, Xinos N, et al. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med*. 2017 Sep;40(3):703–12.
254. Kouka P, Chatzieffraimidi G-A, Raftis G, Stagos D, Angelis A, Stathopoulos P, et al. Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine*. 2018 Aug;47:135–42.
255. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606–16.
256. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577–86.
257. Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L, et al. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Jul 1;54(7):956–66.
258. Kouka P, Tsakiri G, Tzortzi D, Dimopoulou S, Georgia, Sarikaki, et al. The polyphenolic composition of extracts derived from 2 different Greek extra virgin olive oils is correlated with their 3 antioxidant potency. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;article in.
259. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445–600.

260. Illesca PG, Alvarez SM, Selenscig DA, Ferreira MDR, Gimenez MS, Lombardo YB, et al. Dietary soy protein improves adipose tissue dysfunction by modulating parameters related with oxidative stress in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 Apr;88:1008–15.
261. Upadhyay S, Dixit M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2015/06/09. 2015;2015:504253.
262. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci.* 2007 Sep 12;8(9):950–88.
263. Nakagami Y. Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7469326.
264. Bensasson R V, Zoete V, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Two-Step Mechanism of Induction of the Gene Expression of a Prototypic Cancer-Protective Enzyme by Diphenols. *Chem Res Toxicol.* 2008 Apr 1;21(4):805–12.
265. Osburn WO, Kensler TW. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res.* 2008;659(1–2):31–9.
266. Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays.* 2006 Feb;28(2):169–81.
267. Maurya PK, Rizvi SI. Age-Dependent Changes in Glutathione-S-Transferase: Correlation with Total Plasma Antioxidant Potential and Red Cell Intracellular Glutathione. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25(4):398–400.
268. Vyskocilova E, Szotakova B, Skalova L, Bartikova H, Hlavacova J, Bousova I. Age-related changes in hepatic activity and expression of detoxification enzymes in male rats. *Biomed Res Int.* 2013;2013:408573.
269. World Organisation for Animal Health. Animal welfare.
270. Celi P, Gabai G. Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation. Vol. 2, *Frontiers in Veterinary Science* . 2015. p. 48.
271. Gorinstein S, Leontowicz H, Lojek A, Leontowicz M, Ciz M, Krzeminski R, et al. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *J Agric Food Chem.* 2002 Oct;50(21):6102–8.
272. Zhang GF, Yang ZB, Wang Y, Yang WR, Jiang SZ, Gai GS. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance,

- antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens. *Poult Sci.* 2009 Oct 1;88(10):2159–66.
273. Chedea VS, Braicu C, Socaciu C. Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract. *Food Chem.* 2010 Jul 1;121(1):132–9.
274. Vivas N, Nonier M-F, de Gaulejac NV, Absalon C, Bertrand A, Mirabel M. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid c. *Anal Chim Acta.* 2004 Jun 18;513(1):247–56.