



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΝΕΦΡΙΚΟΣ – ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ - ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ
ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ.

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIG
TISSUES (KIDNEY – LUNG - QUADRICEPS) TREATED WITH
POLYPHENOLIC ADDITIVES IN ABLACTATION PERIOD.

Μήτσιος Δημήτριος
Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φυσιολογίας ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του.

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

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Γερασόπουλο ο οποίος τόσο με τις συμβουλές του όσο και με την συνεχή παρουσία στη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας βοήθησε τα μέγιστα και συνέβαλε στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ τους υπολοίπους συναδέλφους του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα και τη συνεργατικότητα κάτι που έκανε την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μία ευχάριστη εμπειρία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για το σκοπό της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι έξι (26) γουρουνιών, τα οποία γεννήθηκαν από δύο (2) χοιρομητέρες, με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στο νεφρικό, πνευμονικό και τετρακέφαλο ιστό. Τα είκοσι έξι (26) χοιρίδια που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από τα νεαρά χοιρίδια στο σιτηρέσιο των οποίων περιέχονταν επιπλέον επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (YAE) τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Τα χοιρίδια εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για τριάντα (30) ημέρες, διότι τις πρώτες 20 ημέρες, τρέφονταν μόνο με το μητρικό γάλα. Πραγματοποιήθηκαν 4 ιστοληψίες – αιμοληψίες. Η πρώτη αιμοληψία – ιστοληψία πραγματοποιήθηκε δύο (2) ημέρες μετά την γέννηση των γουρουνιών, από δύο (2) νεογέννητα, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία. Η δεύτερη αιμοληψία – ιστοληψία έλαβε χώρα με την μερική απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες, σε άλλα δύο (2) νεογέννητα. Τα υπόλοιπα διαχωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες (2) ομάδες, των έντεκα (11) ατόμων. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η πρώτη ομάδα είναι η ομάδα ελέγχου που λαμβάνει το κανονικό σιτηρέσιο και η δεύτερη ομάδα λαμβάνει το πολυφαινολικό σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Η τρίτη αιμοληψία – ιστοληψία πραγματοποιήθηκε σε δέκα (10) χοιρίδια, πέντε (5) από την κάθε ομάδα, ηλικίας τριανταπέντε (35) ημερών ενώ η τελευταία ιστοληψία έγινε σε δώδεκα (12) νεαρά χοιρίδια ηλικίας πενήντα (50) ημερών, έξι (6) από κάθε ομάδα. Εξετάστηκε εάν ο νεφρικός, ο πνευμονικός και ο τετρακέφαλος ιστός, θα παρουσίαζαν βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χοιριδίων τα οποία τρέφονταν με το σιτηρέσιο το οποίο περιείχε τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (YAE). Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν μεθειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances), για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι όλοι οι δείκτες του οξειδωτικού στρες και στις πέντε (5) μετρήσεις βελτιώθηκαν αισθητά και στους τρεις (3) ιστούς. Συνεπώς, από τα παραπάνω αποδείχτηκε η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών πρόσθετων από τα επεξεργασμένα YAE ύστερα από χορήγησή τους σε χοίρους κρεατοπαραγωγής νεαρής ηλικίας.

ABSTRACT

The aim of the present study was to raise young pigs with feed containing polyphenolic additives, from processed OMWW (olive mill waste waters), in order to examine the effect on their antioxidant status in tissues (kidney, lung, quadriceps), using oxidative stress markers.

For this purpose, feed containing polyphenolic additives was given to twenty six (26) young pigs at the stage of ablactation. The twenty six (26) pigs were divided into two (2) groups. In these two groups, different diets were given. The first group was the control group with the basic diet, while the other group was received special feed with polyphenolic additives from processed OMWW. The pigs were fed with the experimental diet for thirty (30) days. Tissues were collected from the experimental animals at 4 different time-points. The first time-point was 2 days after the birth of pigs in order to check their antioxidant status at early age. The second time-point was in the beginning of the ablactation period. The third time-points was at thirty five (35) days after birth, and the last time-point was at fifty (50) days after birth. The following oxidative stress biomarkers were assessed in tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls. The results showed that all oxidative stress markers were significantly improved in all three (3) tissues after feeding with OMWW polyphenolic additives. Therefore, the results of the present study suggest the use of polyphenolic additives from processed OMWW as feeding for young piglets in order to enhance their antioxidant capacity. Moreover, this use would be a valuable way for protecting environment from OMWW by producing a high added value feed for farm animals.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΑΒSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	10
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Οξειδωτικό στρες.....	11
1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός.....	11
1.1.2 Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	12
1.1.4 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	13
1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα.....	14
1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας	16
1.2 Πολυφαινόλες	17
1.2.1 Χημική δομή και ομάδες	17
1.2.2 Φυσιολογικές δράσεις	19
1.2.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία	19
1.2.4 Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.	20
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Γενικά	25
2.2 Περιγραφή σιτηρεσίου	26
2.2.1 Εισαγωγή	26
2.2.2 Χαρακτηριστικά ενσιρώματος.....	29
2.2.3 Παρασκευή και απομόνωση των παραπροϊόντων που περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις από την επεξεργασία λυμάτων ελαιοτριβείων.	29
2.3 Ομογενοποίηση ιστών	33
2.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	34
2.4.1 Γενικά	34
2.4.2 Μέθοδοι.....	34
1. Μέτρηση γλουταθειόνης.....	34

2. Δραστικότητα της καταλάσης	38
3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)	40
4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	43
5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1: pH Ενσιρωμάτων</i>	32
<i>Πίνακας 2: Συστατικά και η διατροφική τους σύσταση στις πειραματικές δίαιτες</i>	32
<i>Πίνακας 3: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH</i>	36
<i>Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης</i>	39
<i>Πίνακας 5: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC</i>	42
<i>Πίνακας 6: Αύξηση GSH στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	50
<i>Πίνακας 7: Αύξηση GSH στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	50
<i>Πίνακας 8: Αύξηση GSH στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	51
<i>Πίνακας 9: Αύξηση Καταλάσης στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	51
<i>Πίνακας 10: Αύξηση Καταλάσης στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	52
<i>Πίνακας 11: Αύξηση Καταλάσης στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	52
<i>Πίνακας 12: Αύξηση TAC στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	53
<i>Πίνακας 13: Αύξηση TAC στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	53
<i>Πίνακας 14: Αύξηση TAC στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	54
<i>Πίνακας 15: Μείωση TBARS στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	54
<i>Πίνακας 16: Μείωση TBARS στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	55
<i>Πίνακας 17: Μείωση TBARS στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	55

<i>Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	
Πίνακας 18: <i>Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	56
Πίνακας 19: <i>Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	56
Πίνακας 20: <i>Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου</i>	57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: <i>Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών</i>	14
Εικόνα 2: <i>Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες</i>	16
Εικόνα 3: <i>Χημικές δομές πολυφαινολών</i>	18
Εικόνα 4: <i>Βιολογικές λειτουργίες πολυφαινολικών συστατικών ελαιολάδου (Cicerale et.al., 2010)</i>	20
Εικόνα 5: <i>Σύσταση πολυφαινολών ελαιολάδου</i>	22
Εικόνα 6: <i>Κατεργασία OMWWW</i>	30
Εικόνα 7: <i>Ομογενοποίηση ιστών με γουδί και γουδοχέρι</i>	33
Εικόνα 8: <i>Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης</i>	35
Εικόνα 9: <i>Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης</i>	35
Εικόνα 10: <i>Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O</i>	38
Εικόνα 11: <i>Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA</i>	43
Εικόνα 12: <i>Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου</i>	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<i>Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης</i>	37
<i>Διάγραμμα 2: Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων</i>	49
<i>Διάγραμμα 3: GSH στο Νεφρικό ιστό</i>	50
<i>Διάγραμμα 4: GSH στον Πνευμονικό ιστό</i>	50
<i>Διάγραμμα 5: GSH στον τετρακέφαλο</i>	51
<i>Διάγραμμα 6: Καταλάση στο Νεφρικό ιστό</i>	51
<i>Διάγραμμα 7: Καταλάση στον Πνευμονικό ιστό</i>	52
<i>Διάγραμμα 8: Καταλάση στον Τετρακέφαλο</i>	52
<i>Διάγραμμα 9: TAC στο Νεφρικό ιστό</i>	53
<i>Διάγραμμα 10: TAC στον Πνευμονικό ιστό</i>	53
<i>Διάγραμμα 11: TAC στον Τετρακέφαλο</i>	54
<i>Διάγραμμα 12: TBARS στο Νεφρικό ιστό</i>	54
<i>Διάγραμμα 13: TBARS στον Πνευμονικό ιστό</i>	55
<i>Διάγραμμα 14: TBARS στον Τετρακέφαλο</i>	55
<i>Διάγραμμα 15: Καρβονύλια στο Νεφρικό ιστό</i>	56
<i>Διάγραμμα 16: Καρβονύλια στον Πνευμονικό ιστό</i>	56
<i>Διάγραμμα 17: Καρβονύλια στον Τετρακέφαλο</i>	57
<i>Διάγραμμα 18: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες (Ηλικία 35 Ημερών)</i>	58
<i>Διάγραμμα 19: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες (Ηλικία 50 Ημερών)</i>	58

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξειδωτικό στρες

1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας των Gersham et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, ο Denham Harman το 1956 διατύπωσε την υπόθεση ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ – ROS) μπορεί να παίζουν ρόλο στην κυτταρική βλάβη, τη μεταλλαξιγένεση, τον καρκίνο και τις εκφυλιστικές διεργασίες της βιολογικής γήρανσης. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι πλέον σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές (Valko, M., et al., 2007). Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων» (Sies, H., et al., 1985).

1.1.2 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό (Halliwell, B., et al., 2007). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, είτε από διάσπαση ομοιοπολικών ή ετεροπολικών δεσμών. Κατά τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής

αντίδρασης (Halliwell, B., et al., 1990). Αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς.

1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Το μόριο του οξυγόνου στη βασική του (μη διεγερμένη) κατάσταση εμπίπτει στον ορισμό της ελεύθερης ρίζας αφού διαθέτει δύο μονήρη (ή ασύζευκτα) ηλεκτρόνια με ίδιας κατεύθυνσης στροφορμές (spin), που καταλαμβάνουν το καθένα ένα διαφορετικό μοριακό τροχιακό. Η κατανομή αυτή προσδίδει στην όλη δομή υψηλού βαθμού χημική σταθερότητα, αφού προκειμένου το O_2 να αντιδράσει απευθείας με κάποια ένωση, θα πρέπει η ένωση αυτή να διαθέτει επίσης δύο μονά ηλεκτρόνια με στροφορμή αντίθετη ως προς αυτή των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του O_2 (Patsoukis, N., et al., 2006). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) είναι γενικός και αναφέρεται όχι μόνο σε ελεύθερες ρίζες με βάση το οξυγόνο, αλλά και σε δραστικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell, B., et al., 2007). Οι ΔΜΟ σχηματίζονται ως ένα φυσικό υποπροϊόν του κανονικού μεταβολισμού του οξυγόνου και έχουν σημαντικούς ρόλους στην κυτταρική σηματοδότηση και την ομοιόσταση. Ωστόσο, σε περιόδους περιβαλλοντικού στρες, όπως είναι η έκθεση σε θερμότητα, τα επίπεδα των ΔΜΟ μπορεί να αυξηθούν δραματικά (Devasagayam, T., et al., 2004). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική βλάβη στις κυτταρικές δομές. Αθροιστικά, αυτό είναι γνωστό ως το οξειδωτικό στρες. ΔΜΟ παράγονται επίσης από εξωγενείς πηγές, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία.

Οι κυριότερες ΔΜΟ είναι: η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^{\bullet}$), η ρίζα υπεροξειδίου ($-ROO^{\bullet}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το O_2 απλής κατάστασης, και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Farrukh, A., et al., 2012 - Weisburger, J., et al., 2001). Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος.

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα.. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστικότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova, Z., et al., 2010).

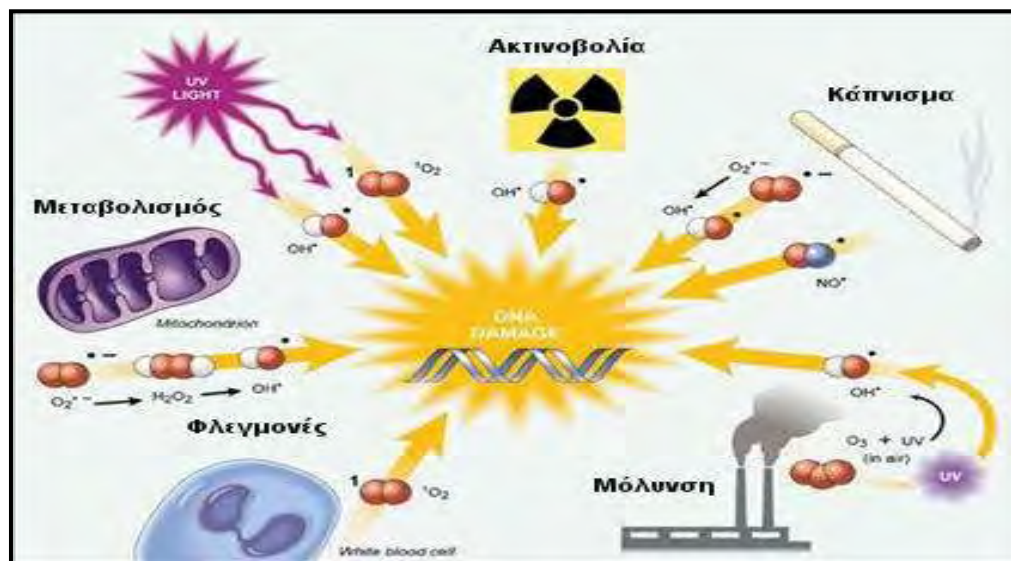
1.1.4 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να σχηματιστούν τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Ενδογενώς, σχηματίζονται μέσω των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, από όλα τα αερόβια κύτταρα μέσω της δράσης πολλών ενζύμων και πολλές φορές ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων που περιλαμβάνουν το τραύμα, τις μολύνσεις και άλλα. Οι βασικότερες πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής:

- Ενζυμικά συστήματα όπως είναι το κυτόχρωμα P450, η οξειδάση του NAD(P)H, η λιποοξυγονάση, η κυκλοοξυγονάση και η οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν τις κυριότερες ενζυμικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.
- Ιόντα μετάλλων τα οποία αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες. Στην ελεύθερη μορφή τους, τα ιόντα αυτά μπορούν, μέσα σε βιολογικά συστήματα, να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA προκαλώντας έτσι καταστροφές.
- Φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.
- Μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η κυριότερη πηγή ΔΜΟ στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού (Valko, M., et al., 2007).

Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν και αρκετοί εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Αυτοί οι παράγοντες είναι τα συστατικά του καπνίσματος, η περιβαλλοντική ρύπανση, ο μεταβολισμός συγκεκριμένων διαλυτών, φαρμάκων, παρασιτοκτόνων καθώς και μέσω της έκθεσης στην ραδιενέργεια – ακτινοβολία.



Εικόνα 1: Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα

Για την εξάλειψη του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητη η ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες δε δρουν ανεξέλεγκτα. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από την φύση του για να αμύνεται στην δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου. Τα αντιοξειδωτικά αυτά λειτουργούν ως εξής: αναστέλλουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από το O_2 σε οργανικά μόρια, σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες και τερματίζουν τις αντιδράσεις αυτών. Γενικά χαρακτηρίζουμε ως αντιοξειδωτική ουσία κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Kaplan, M., et al., 2001).

Οι αμυντικοί μηχανισμοί οι οποίοι προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες περιλαμβάνουν μηχανισμούς πρόληψης, μηχανισμούς

επιδιόρθωσης, φυσικές άμυνες και αντιοξειδωτικές άμυνες (Valko, M., et al., 2007).

Στη βιοχημεία και την ιατρική, τα αντιοξειδωτικά είναι ένζυμα ή άλλες οργανικές ουσίες, όπως η βιταμίνη E ή το β-καροτένιο, που έχουν την ικανότητα να αντισταθμίζουν τις καταστροφικές επιπτώσεις της οξείδωσης στους ιστούς των ζώων (Halliwell, B, et al., 2007).

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα λειτουργούν σε 2 επίπεδα:

- i. Αναστολή υπερβολικού σχηματισμού ΔΜΟ και
- ii. Δέσμευση ελευθέρων ριζών και αποτροπή αλυσιδωτών αντιδράσεων που προκαλούν.

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι:

- Αντιοξειδωτικά ένζυμα
- Αντιοξειδωτικά μέταλλα
- Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά συστήματα (ενδογενή αντιοξειδωτικά) τα οποία μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά ή τα λαμβάνει εξωγενώς (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι το κυτόχρωμα C, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης και η καταλάση. Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται η α-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο και το συνένζυμο Q10 τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις μεμβράνες ενώ, υπάρχουν και το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η τρανσφερίνη, η χολερυθρίνη, η γλουταθειόνη, η λακτοφερίνη κ.α. τα οποία βρίσκονται έξω από τις μεμβράνες.

Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται οι δεσμευτές ελευθέρων ριζών όπως είναι η βιταμίνη-E, το σύμπλεγμα της οποίας είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα αντιοξειδωτικά στη φύση. Η βιταμίνη E αντιδρά εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων και ενώ οξειδώνεται η ίδια, αποτρέπει την οξείδωση των λιπιδίων και την περαιτέρω καταστροφή των ιστών. Η οξειδωμένη μορφή της E ανάγεται με τη βοήθεια της βιταμίνης C και της γλουταθειόνης (Janero, D., et al., 1991).

Επίσης, περιλαμβάνεται τόσο η βιταμίνη-C, όσο και το β-καροτένιο. Επιπλέον, άλλα εξωγενή αντιοξειδωτικά αποτελούν διάφορα ιχνοστοιχεία όπως ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu) και μαγνήσιο (Mg). Τέλος, κάποια φάρμακα και κάποιες ουσίες

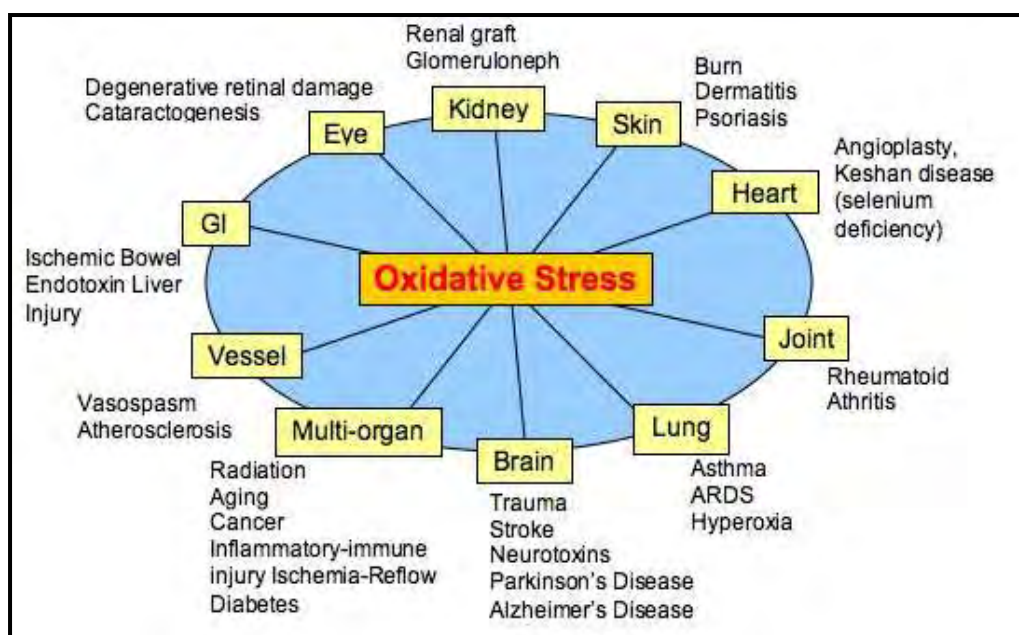
που επιδρούν στο μεταβολισμό των ελευθέρων ριζών έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν ως εξωγενή αντιοξειδωτικά.

1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Parkinson και Alzheimer, ο καρκίνος και η διαδικασία της γήρανσης (Vera, D., et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα η περίσσεια ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των νουκλεϊκών οξέων (αυξημένος κίνδυνος καρκινογένεσης), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής) και των πρωτεϊνών. Οι ασθένειες οι οποίες συνδέονται με τη ζημιά λόγω ελευθέρων ριζών είναι καρδιακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, αναπνευστικά προβλήματα, δερματικές παθήσεις, περιβαλλοντική ευαισθησία, φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, χρόνια σύνδρομο κόπωσης καθώς και AIDS ή παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, B., et al., 2011).

Σε κλινικό επίπεδο οι ελεύθερες ρίζες και τα υπεροξειδία λιπιδίων βρίσκονται ανεβασμένα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο όπως επίσης και σε ασθενείς με ασθένειες των νεφρικών τριχοειδών (Andras, P., et al., 2013).



Εικόνα 2: Ασθένειες προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες

1.2 Πολυφαινόλες

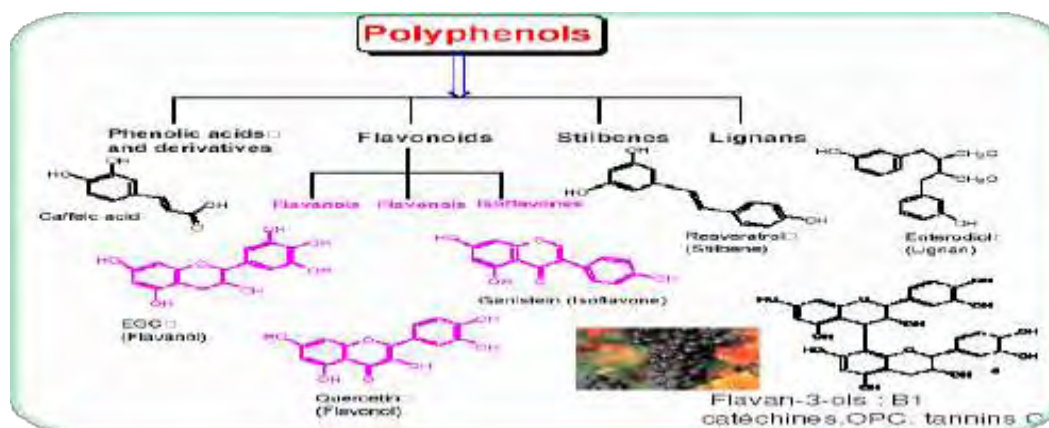
Οι πολυφαινόλες είναι μια δομική κατηγορία που αποτελείται κυρίως από φυσικές αλλά επίσης και συνθετικές ή ημισυνθετικές, οργανικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων των δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, S., et al., 2011).

Βρίσκονται στα φυτά και στα τρόφιμα, τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές εισβολές, ενισχύοντας τη φυσική τους άμυνα. Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Η κύρια πηγή για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοθεραπευτικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα (όπως μήλα, μούρα, πεπόνι, κεράσια, βακκίνια, σταφύλια, αχλάδια, δαμάσκηνα, βατόμουρα, και φράουλες), και λαχανικά (όπως μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, το ελαιόλαδο, η γύρη της μέλισσας είναι εναλλακτικές πηγές. Χιλιάδες είναι τα αντιοξειδωτικά και καθένα από αυτά έχει διαφορετικές ιδιότητες. Διαχωρίζονται σύμφωνα με τη χημική τους δομή σε μεγάλες ομάδες.

1.2.1 Χημική δομή και ομάδες

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

- Φλαβονοειδή. Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα.
- Φαινολικά οξέα. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικρκινικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.
- Ανθοκυανίνες. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία πρόκειται για τις χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα στα ρόδια, στα σταφύλια, στα κόκκινα κρεμμύδια, στα μπλε μούρα και άλλα.
- Στιλβένια. Με την πιο διάσημη από αυτά την Ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρομάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.
- Λιγνάνες. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά , ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007).



Εικόνα 3: Χημικές δομές πολυφαινολών

Το μέγεθος όλων αυτών των πολυφαινολών ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους.

1.2.2 Φυσιολογικές δράσεις

Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων.

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog., M., et al., 1995).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η προσθήκη χρώματος, η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και η συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003). Επιπλέον, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (John Hart., H., et al., 1974).

1.2.3 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

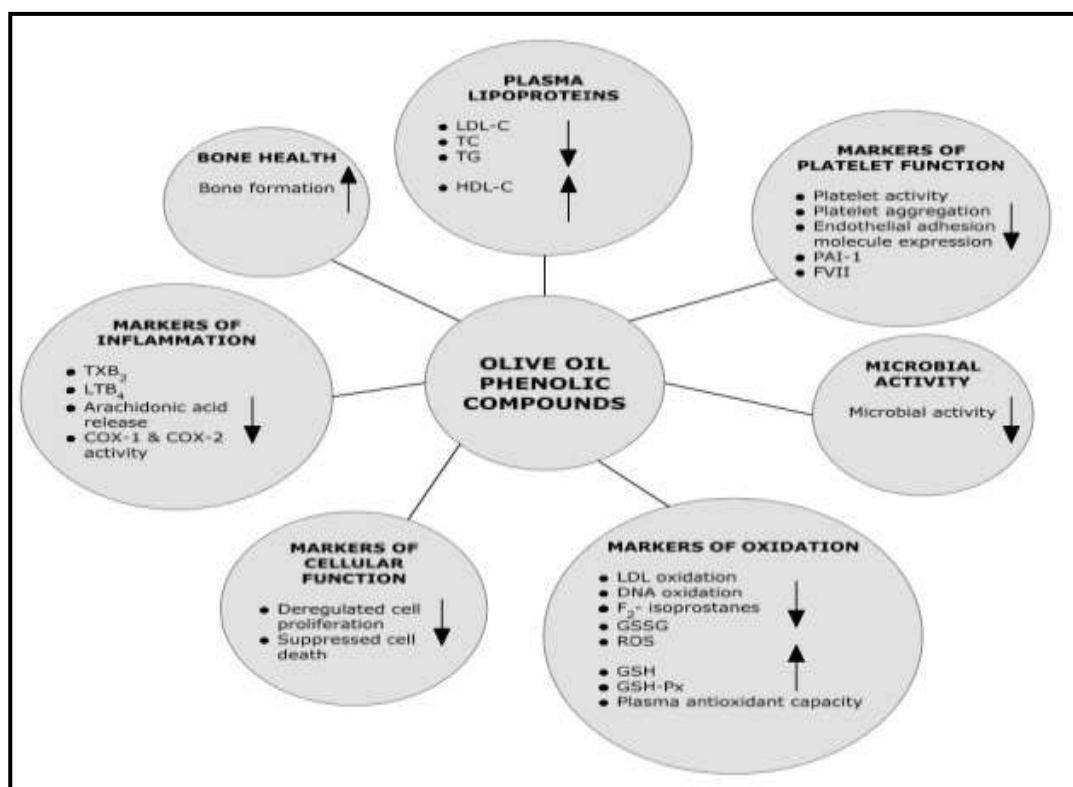
Στην περίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών, το οξειδωτικό στρες και οι ΔΜΟ εμπλέκονται σε ενδοθηλιακές βλάβες, σε δημιουργία αρτηριοσκλήρυνσης και σε παρατεταμένη ζημιά η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και σε ισχαιμική επανέγχυση.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των φυσικών διατροφικών πολυφαινολών στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας και έχει τονιστεί ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτές οι ουσίες στον περιορισμό των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης. Πολυφαινόλες όπως η ρεσβερατρόλη, επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η κουρκουμίνη έχουν αναγνωριστεί και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή υγεία, ενώ ορισμένες έχουν επίσης δειχθεί ότι είναι προστατευτικές ενάντια στη γήρανση (Sandhya, K., et al., 2013).

Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων.

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

Ιδιαίτερα για τις πολυφαινόλες οι οποίες βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατ'επέκταση στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε.), διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχουν δείξει ότι τα πολυφαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου έχουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να μειώσουν αποτελέσματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών (Cicerale, S., et al., 2009).



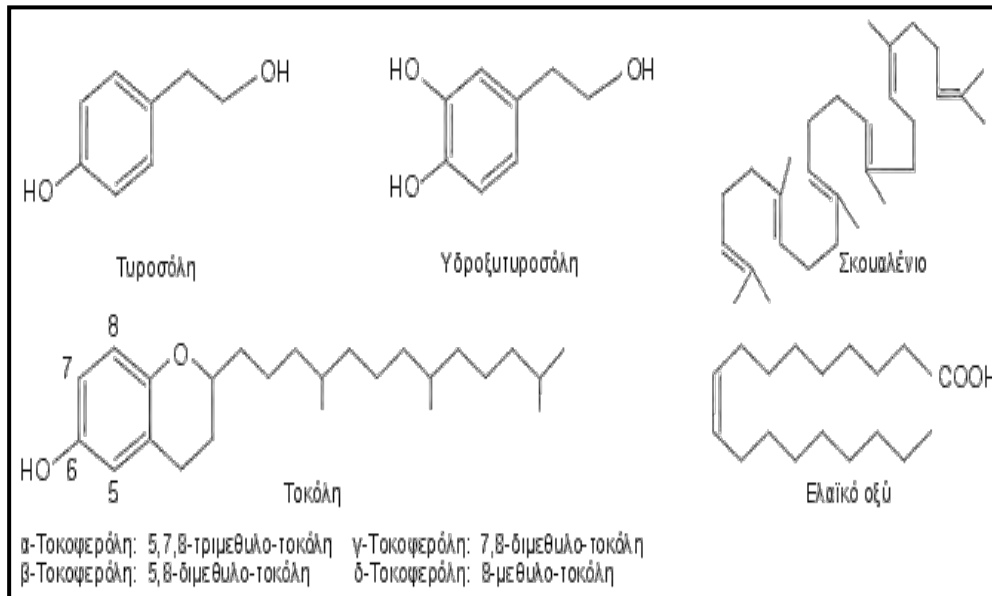
Εικόνα 4: Βιολογικές λειτουργίες πολυφαινολικών συστατικών ελαιολάδου (Cicerale et.al., 2010)

Η μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης της αρτηριοσκλήρυνσης, των καρδιαγγειακών παθήσεων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και ορισμένων τύπων καρκίνου. Τα προφανή οφέλη για την υγεία έχουν εν μέρει αποδοθεί στη διατροφική κατανάλωση του παρθένου ελαιολάδου των

μεσογειακών λαών. Στο ελαιόλαδο υπάρχουν διάφορες πολυφαινόλες οι οποίες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για αυτά τα οφέλη. Μελέτες, (ανθρώπου και ζώων, *in vivo* και *in vitro*) απέδειξαν ότι, οι πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο και συνεπώς στα Υ.Α.Ε., έχουν θετικές επιδράσεις σε ορισμένες φυσιολογικές παραμέτρους, όπως είναι οι λιποπρωτεΐνες πλάσματος, η οξειδωτική βλάβη, οι δείκτες φλεγμονής, η κυτταρική λειτουργία, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα και η υγεία των οστών (Sara, C., et al., 2010).

Η ελαιοευρωπεΐνη, είναι ένας γλυκοζίτης και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε. Η ελαιοευρωπεΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintileso στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Guiso, M., et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη αυτή και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως και διάφορα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της "συγκόλλησης" των αιμοπεταλίων. Η ελαιοευρωπεΐνη και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν προστατευτική τους δράση, κυρίως αντιοξειδωτική (Βαλαβανίδης, et al., 2007).

Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του ελαϊκού οξέος, εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό στρες των αερόβιων οργανισμών (Visioli, F., et al., 1998). Αυτή η αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση, όπως και άλλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου. Άλλα συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βανιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες (Papadopoulos, GK., et al., 1991).



Εικόνα 5: Σύσταση πολυφαινολών ελαιολάδου

Οι ωφέλιμες επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε. μπορεί να είναι στοχευμένες όπως οι εξής:

i. Στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (TC) και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL-C), έχουν καθιερωθεί ως παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, η οποία είναι η κύρια αιτία της καρδιαγγειακής νόσου (CVD). Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, τα υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL-C) πιστεύεται ότι έχουν προστατευτικές, αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες (Gordon, T., et al., 1981). Τα δεδομένα από μια ελεγχόμενη ανθρώπινη μελέτη που περιείχε 200 υγιείς άνδρες, δείχνουν ότι βρέθηκε μείωση της TC σε σχέση με την HDL-C, η οποία προήλθε από κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου πλούσιο σε πολυφαινολικά συστατικά. Σημειώνεται επίσης μία αύξηση στην HDL-C με την αυξημένη φαινολική συγκέντρωση του ελαιολάδου (Covas, M., et al., 2006).

ii. Στην οξείδωση των λιπιδίων. Η οξείδωση της LDL (oxLDL) θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου (Witztum, J., et al., 1994). Η οξείδωση της LDL προκαλεί βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα, διεγείροντας την πρόσληψη μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος (Fito., M., et al, 2005 – Vissers, M., et al., 2001). Έρευνες που

πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (in vivo) έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο η LDL οξειδώνεται, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών (Covas, M., et al., 2006 – Nicolaiew, N., et al., 1998 – Ramirez, Tortosa, C., et al., 1999).

iii. Στην οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η οξειδωτική βλάβη στο DNA είναι ένα πρόδρομο γεγονός για την ανθρώπινη καρκινογένεση και είναι γνωστό ότι ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν συνεχώς τα ανθρώπινα κύτταρα (Cooke, MS., et al., 2003). Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει δειχθεί πως η πρόσληψη συστατικών ελαιολάδου πλούσιο σε πολυφαινόλες μειώνει τις βλάβες στο DNA έως και 30% σε σύγκριση με πρόσληψη ελαιολάδου φτωχού σε πολυφαινόλες (Salvini, S., et al., 2006).

iv. Σε δείκτες φλεγμονής. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής στον ορό σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η θρομβοξάνη B2 του πλάσματος (TXB2) και το λευκοτριένιο B4 (LTB4) είναι γνωστοί ως προφλεγμονώδεις παράγοντες. Η TXB2 έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του αίματος και το LTB4 έχει χημειοστατική επίδραση επί των ουδετεροφίλων, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε κατεστραμμένο ιστό (Bogani, P., et al., 2007 – Reinisch, N., et al., 1998). Αυτοί οι παράγοντες είναι γνωστό ότι παράγουν τον πόνο, την ερυθρότητα και το οίδημα που σχετίζεται με φλεγμονή. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε μία μείωση στις συγκεντρώσεις των TXB2 και LTB4 με αυξανόμενη συγκέντρωση πολυφαινολών του ελαιολάδου (Visioli, F., et al., 2005 – Weinbrenner, T., et al., 2004).

v. Στην κυτταρική λειτουργία. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η καταστολή του κυτταρικού θανάτου είναι βασικοί παράγοντες για το σχηματισμό όγκων και την εξέλιξη αυτών (Evan, GI., et al., 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι η φαινόλη του ελαιολάδου υδροξυτυροσόλη, αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 και σε ανθρώπινες σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. Έρευνες δείχνουν ότι ο β υποδοχέας οιστρογόνου έχει μια προστατευτική επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ο β υποδοχέας οιστρογόνου είναι ο κύριος υποδοχέας οιστρογόνου και εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο από την κανονική βλεννογόνο ανθρώπινου εντέρου. Σε ένα καρκινικό κόλον, ωστόσο, η έκφραση του β υποδοχέα οιστρογόνου μειώνεται και συνδέεται με την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος

εντέρου. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλούν οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιολάδου, οι οποίες δρουν σαν αντικαρκινικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι περισσότερες φαινόλες έχουν χημική δομή παρόμοια με αυτήν της 17 β-οιστραδιόλης (κύρια μορφή του οιστρογόνου στον άνθρωπο) και μπορούν να είναι προστατευτικές έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου ενεργώντας ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνου (Sukhsatej, B., 2014).

vi. Στη μικροβιακή δραστηριότητα. Έρευνες *in vitro* έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις στο λάδι, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίων πολλών στελεχών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές λοιμώξεις (Medina, E., et al., 2006).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε εκτροφή χοιριδίων με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο χοιροστάσιο του ΤΕΙ / Θεσσαλίας.

Γεννήθηκαν είκοσι έξι (26) χοιρίδια από δύο (2) χοιρομητέρες. Η διαβίωση και ανάπτυξη των νεογέννητων έγινε στον θάλαμο ξηράς περιόδου, τοκετού και απογαλακτισμού του χοιροστασίου του ΤΕΙ Θεσσαλίας. Τα είκοσι έξι (26) αυτά νεαρά χοιρίδια παρακολουθούνταν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους και εκτρέφονταν σύμφωνα με το πειραματικό πλάνο το οποίο περιλάμβανε εκτροφή με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου στο στάδιο του απογαλακτισμού, δηλαδή είκοσι (20) μέρες μετά τη γέννηση. Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του απογαλακτισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους για χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη βδομάδα του απογαλακτισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες. Μέχρι και την εικοστή (20) ημέρα από τη γέννηση, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Η ολική απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες τους έγινε τριανταπέντε (35) μέρες μετά τη γέννησή τους.

Τα είκοσι έξι (26) χοιρίδια που εκτράφηκαν συνολικά, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες και σε διαφορετικά χρονικά σημεία πραγματοποιήθηκαν τέσσερις (4) ιστοληψίες. Η πρώτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε δύο (2) ημέρες μετά την γέννηση των γουρουνιών, από δύο (2) νεογέννητα, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία. Η δεύτερη ιστοληψία έλαβε χώρα με την μερική απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες, σε άλλα δύο (2) νεογέννητα. Είκοσι (20) ημέρες από την γέννησή τους, ξεκίνησε ο απογαλακτισμός τους και τα είκοσι δύο (22) εναπομείναντα χοιρίδια, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, εκ των οποίων έντεκα (11) αποτέλεσαν την ομάδα Α (ελέγχου) και τα άλλα έντεκα (11) την ομάδα Β, όπου στο σιτηρέσιό της υπήρχαν πολυφαινολικά πρόσθετα. Η τρίτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε σε δέκα (10) χοιρίδια ηλικίας τριανταπέντε (35)

ημερών, ενώ η τελευταία ιστοληψία έγινε σε δώδεκα (12) νεαρά χοιρίδια ηλικίας πενήντα (50) ημερών. Οι τέσσερις (4) αυτές ιστοληψίες των ιστών (νεφρικός, πνευμονικός και τετρακέφαλος) , έλαβαν χώρα στο μικροσφαγείο που υπάρχει στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

Έπειτα από τις ιστοληψίες, κάθε δείγμα μεταφέρθηκε, σε υγρό άζωτο, άμεσα στο εργαστήριο φυσιολογίας ζωικών οργανισμών όπου και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους -80 °C για μετέπειτα επεξεργασία. Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των ιστών και στη συνέχεια ακολούθησε η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

2.2 Περιγραφή σιτηρεσίου

2.2.1 Εισαγωγή

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία υψηλής πεπτικότητας και ικανοποιητικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πιο κατάλληλα φυτά που προσφέρονται για ενσίρωση είναι το καλαμπόκι και η μηδική.

Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε αρχικά να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι. Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βακτήρια. Τα βακτήρια τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Αυτά που είναι επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα .

Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν να μετατρέψουν υδατάνθρακες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα. Το

γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων.

Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

Για το ενσίρωμα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται ζυμώνουν τους υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες (WSC) στην καλλιέργεια σε γαλακτικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό σε οξικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η μείωση του pH του ενσιρωμένου υλικού οφείλεται στην παραγωγή αυτών των οξέων με αποτέλεσμα την αναστολή των μικροοργανισμών αλλοίωσης της τροφής. Μόλις η τροφή προς ενσίρωση έχει αποκλειστεί από τον αέρα, η διαδικασία ενσίρωσης μπορεί να διαιρεθεί σε 4 φάσεις (Stefanie, J., et al., 2008).

Φάση 1^η: Αερόβια Φάση

Η φάση αυτή συνήθως διαρκεί μόνο λίγες ώρες στις οποίες το ατμοσφαιρικό οξυγόνο παρόν μεταξύ των σωματιδίων των φυτών μειώνεται, λόγω της αναπνοής του φυτικού υλικού αλλά και των αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών, όπως ζύμες και εντεροβακτήρια. Επιπλέον, τα ένζυμα φυτών όπως πρωτεάσες αλλά και ένζυμα που διασπούν υδατάνθρακες είναι ενεργά κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, εφόσον το pH εξακολουθεί να είναι εντός του φυσιολογικού εύρους για φρέσκο ενσίρωμα (pH 6.5-6.0).

Φάση 2^η: Φάση Ζύμωσης

Αυτή η φάση ξεκινά όταν η ενσίρωση γίνεται αναερόβια, και αυτό συνεχίζεται για αρκετές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με τις ιδιότητες των τροφών προς ενσίρωση και τις συνθήκες αποθήκευσης. Αν η ζύμωση προχωρά με επιτυχία, αναπτύσσονται τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, και γίνονται ο κυρίαρχος πληθυσμός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Λόγω της παραγωγής γαλακτικού και άλλων οξέων το pH μειώνεται σε 3,8 - 5,0.

Φάση 3^η: Σταθερή Φάση

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φάσης 2 σιγά-σιγά μειώνονται σε αριθμούς. Μερικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξύ επιβιώνουν

σε αυτή τη φάση σε μια σχεδόν ανενεργή κατάσταση, άλλοι, όπως clostridia και bacilli επιβιώνουν ως σπόρια. Μόνο μερικές πρωτεάσες και καρβουδράσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο οξύ και κάποιοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, όπως *Lactobacillus buchneri* συνεχίζουν να είναι ενεργοί σε χαμηλό επίπεδο.

Φάση 4^η : Αερόβια Φάση Αλλοίωσης

Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ενσιρώματος στην τροφή των ζώων αυτό είναι αναπόφευκτο, αλλά μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει νωρίτερα λόγω βλάβης του καλύμματος αποθήκευσης του ενσιρώματος. Η διαδικασία της αλλοίωσης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η έναρξη της φθοράς μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση των οργανικών οξέων, που συμβάλλουν στην διατήρηση, από ζύμες και περιστασιακά βακτήρια οξικού οξέος. Αυτό θα προκαλέσει μια αύξηση στο pH και ως εκ τούτου το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως βάκιλλοι, έχει ξεκινήσει. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ωστόσο, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

Η είσοδος του αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμη και να εμποδίσει την επίτευξη σωστών επιπέδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της ενσιρωμένης τροφής. Είσοδος του αέρα μετά αφού η διαδικασία της ενσίρωσης έχει φτάσει σε σταθερή κατάσταση θα οδηγήσει σε απώλεια της σταθερής κατάστασης μέσω αναπνοής και τη περεταίρω μείωση των υδατανθράκων. Αυτό θα μικρύνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Όταν η ενσίρωση ενσωματώνεται σε ένα σύστημα καλλιέργειας, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγικότητα και την αποτελεσματικότητα χρησιμοποίησης των διαθέσιμων πόρων. Σε γενικές γραμμές, με τη χορήγηση ενσιρώματος αυξάνεται η παραγωγικότητα των ζώων, λόγω καλύτερης διατροφής και συνδυάζεται η γεωργική με την κτηνοτροφική κατεύθυνση της επιχείρησης.

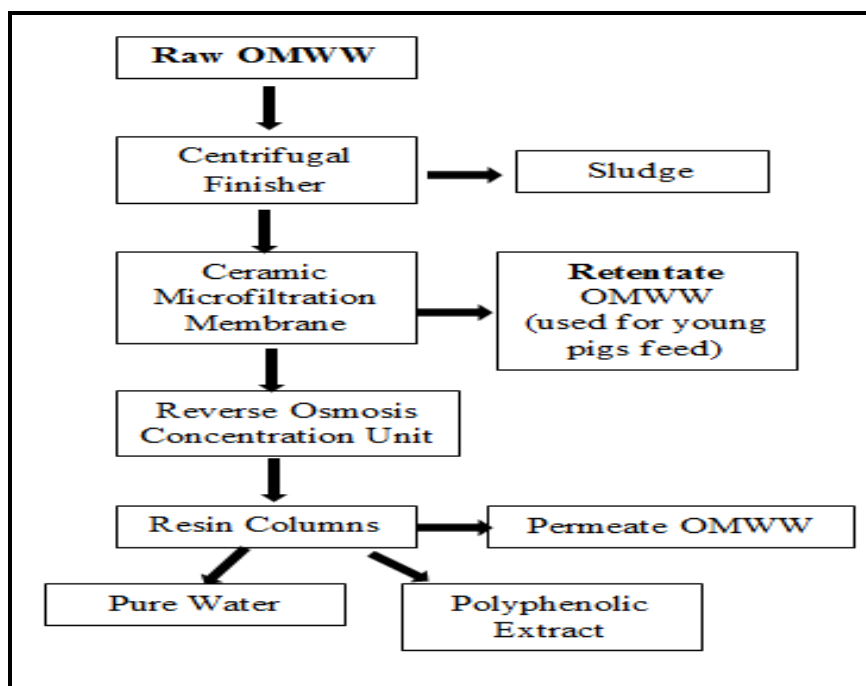
2.2.2 Χαρακτηριστικά ενσίρωματος

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

2.2.3 Παρασκευή και απομόνωση των παραπροϊόντων που περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις από την επεξεργασία λυμάτων ελαιοτριβείων.

Ως μέρος κατοχυρωμένης με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας συστήματος παραγωγής σκόνης από πολυφαινόλες των λυμάτων ελαιοτριβείων, παρήχθησαν δύο υποπροϊόντα που περιέχουν αντιοξειδωτικές πολυφαινολικές ενώσεις, που θα πρέπει να απορρίπτονται φιλικά προς το περιβάλλον. Για το σκοπό αυτό, σε αυτή την μελέτη και σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, επιλέχθηκε η παραγωγή ζωοτροφών με το ένα υποπροϊόν και συγκεκριμένα το κατακράτημα των υγρών αποβλήτων ύστερα από μικροδιήθηση σε κεραμικές μεμβράνες.

Σύμφωνα με το πατενταρισμένο σύστημα παραγωγής (Εικ. 6) τα ακατέργαστα λύματα των ελαιοτριβείων, πρώτα διέρχονται μέσω ενός φίλτρου (finisher), προκειμένου να διαχωριστούν τα αιωρούμενα σωματίδια με τη μορφή μιας βαριάς ύλης. Το φίλτρο που χρησιμοποιείται για αυτό το πρώτο στάδιο επεξεργασίας, λειτουργεί στα 1200 rpm / min και είναι εξοπλισμένο με ένα κυλινδρικό κόσκινο από ανοξείδωτο χάλυβα με ανοίγματα διαμέτρου 150 μm. Τα σωματίδια από τα ακατέργαστα λύματα ελαιοτριβείου απομακρύνθηκαν με το παραπάνω φίλτρο, προκειμένου να αποφευχθεί η απόφραξη των κεραμικών μεμβρανών μικροδιήθησης στα επόμενα στάδια.



Εικόνα 6: Κατεργασία OMWWW.

Στη συνέχεια, τα αρχικά επεξεργασμένα λυμάτα των ελαιοτριβείων διήλθαν διαμέσου μίας κεραμικής μονάδας μικροδιήθησης, όπου το 30% από το ρεύμα των λυμάτων ελαιοτριβείων εισόδου διαχωρίστηκε ως κατακράτημα –Retentate, (αυτό χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενσίρωσης που χρησιμοποιήθηκε στην πολυφαινολική ομάδα των χοίρων και ορίζεται εφεξής ως κατακράτημα λυμάτων ελαιοτριβείων) και το 70% ως προϊόν διήθησης –Permeate. Η μονάδα μικροδιήθησης που χρησιμοποιήθηκε ως μέρος της παραγωγής προμηθεύτηκαν από Jiangsu Jiuwu Hi-Tech Co Ltd (Nanjing, Κίνα). Αποτελείται από τρία κεραμικές μεμβράνες μικροδιήθησης με συνολική έκταση 0,69 m². Ο τύπος της μεμβράνης ήταν ο CMF19040. Η μονάδα τροφοδοτείται με μια αντλία που εξασφαλίζει ταχύτητα ρευστού 10 m / sec, προκειμένου να αποφευχθεί η απόφραξη της μεμβράνης.

Η επεξεργασία των υποπροϊόντων εξασφάλισε μια συνολική απαλλαγή από τα λύματα των ελαιοτριβείων και την πλήρη προστασία του οικοσυστήματος.

2.2.4 Προετοιμασία Ενσιρώματος και Σιτηρεσίου των Χοίρων.

Το κατακράτημα των επεξεργασμένων λυμάτων ελαιοτριβείων χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ενσιρώματος αραβοσίτου. Για το σκοπό αυτό, το καλαμπόκι αναμίχθηκε με το κατακράτημα σε αναλογία 24:1. Έτσι, το ενσίρωμα

που προήλθε περιείχε καλαμπόκι 56% στερεά, 4% στερεά κατακράτημα και 40% υγρά. Σε όλες της περιπτώσεις η ανάμιξη πραγματοποιήθηκε με γνώμονα την παραγωγή τελικού υλικού με στερεά 60% κ.β.

Για την υποβοήθηση της γαλακτικής ζύμωσης, η οποία παρήγαγε τα ενσίρωματα χρησιμοποιήθηκε στάνταρ εμπορικό σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων που διαλυόταν σε νερό και μετά από μία διαδικασία αναγέννησης γινόταν προσθήκη του στο υγρό που αναμιγνυόταν με το καλαμπόκι σε κάθε παρτίδα παραγωγής ενσίρωματος. Ζυγίζονταν 1 gr σκόνης λυοφιλομένων βακτηρίων για κάθε 100 κιλά τελικού ενσιρωμένου προϊόντος. Τα βακτήρια αυτά στην συνέχεια διαλυόταν σε νερό βρύσης μέσω ανάδευσης και θέρμανσης στους 40 °C σε αναλογία 1/10 W/V, με σκοπό να είναι πλήρως ενεργοποιημένα πριν από την προσθήκη τους στο υγρό της ενσίρωσης. Μετά την προσθήκη της καλλιέργειας και την ανάμιξη, το προς ενσίρωση μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδικές αεροστεγείς πλαστικές σακούλες, του ενός κιλού, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν με θερμοσυγκόλληση αεροστεγώς με χρήση ειδικού μηχανήματος. Μετά την σφράγιση τους οι σακούλες που περιείχαν το προς ενσίρωση υλικό που βρισκόταν υπό κενό άρχισε με την βοήθεια των λακτοβακίλλων που είχαν προστεθεί σ' αυτό να ζυμώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού οξέως και διοξειδίου του άνθρακα το οποίο διόγκωνε τις πλαστικές σακούλες. Για το λόγο αυτό και για να αποτραπεί η διάρρηξη των σακουλών και η δημιουργία αερόβιων συνθηκών που δεν ευνοούν την γαλακτική ζύμωση, κάθε δύο με τρεις ημέρες το υλικό υφίστατο εκ νέου ανασυσκευασία σε πλαστικές νέες πλαστικές σακούλες κατά τον ίδιο τρόπο και πάλι υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphen.), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραίωση του ενσίρωματος με αποσταγμένο νερό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: pH Ενσιρωμάτων

Silage Sample Code	pH			
	Day 0	Day 7	Day 15	Day 21
A (Control Group)	6,20	4,94	4,44	4,08
B (Polyph. Group)	5,19	4,02	4,04	3,96

Τα ενσιρώματα αναμίχθηκαν με άλλα υλικά και δημιουργήθηκε έτσι το τελικό σιτηρέσιο (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Συστατικά και η διατροφική τους σύσταση στις πειραματικές δίαιτες.

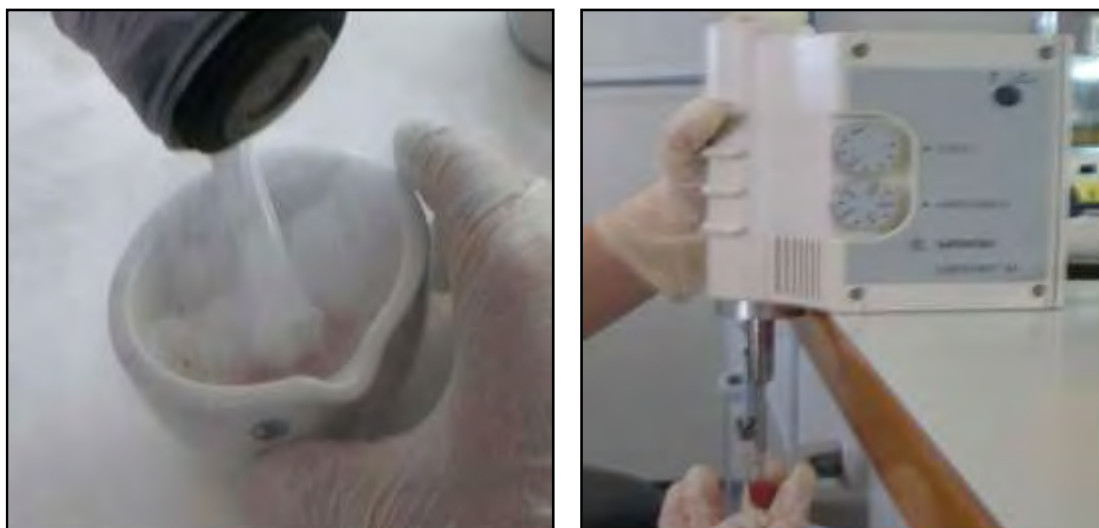
Συστατικά	Σύνθεση (% w/w)
Καλαμπόκι	46.5 ^a
Σογιάλευρο	21.0
Ορός Γάλακτος	20.0
Συμπύκνωμα (Provet)	10.0
Ισσοροπιστής (Piglets Corn 2,5%)	2.5
ΣΥΝΟΛΟ	100.0

^a Το Καλαμπόκι περιείχε 60% στερεά και 40% υγρά στην ομάδα ελέγχου, 56% στερεά, 4% στερεά από κατακράτημα OMWW και 40% υγρό στην ομάδα Β.

2.3 Ομογενοποίηση ιστών

Τα δείγματα του νεφρικού, του πνευμονικού και του τετρακέφαλου, αφαιρέθηκαν χειρουργικά, τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1 προς 2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCL, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH).

Κατά την προετοιμασία για τη βιοχημική ανάλυση του ιστού τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο.



Εικόνα 7: Ομογενοποίηση ιστών με γουδί και γουδοχέρι

Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε

2.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

2.4.1 Γενικά

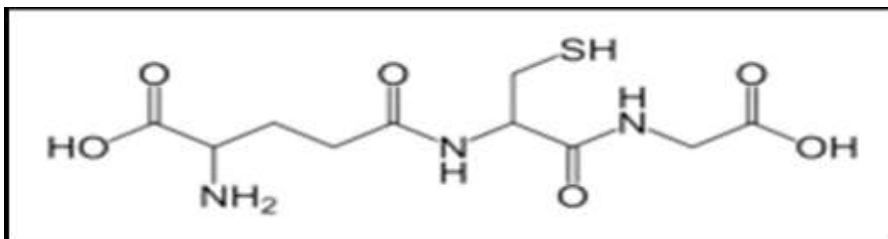
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού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

2.4.2 Μέθοδοι

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι δείκτες οξειδωτικού στρες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών (νεφρικός, πνευμονικός, τετρακέφαλος) των χοιριδίων που ανήκαν στο control και στο πολυφαινολικό γκρουπ, είναι πέντε (5) και μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά. Κάθε ένας αναλύεται στη συνέχεια.

1. Μέτρηση γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore., A., et al., 2003).

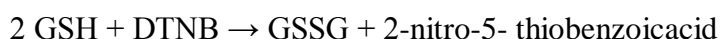


Εικόνα 8: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

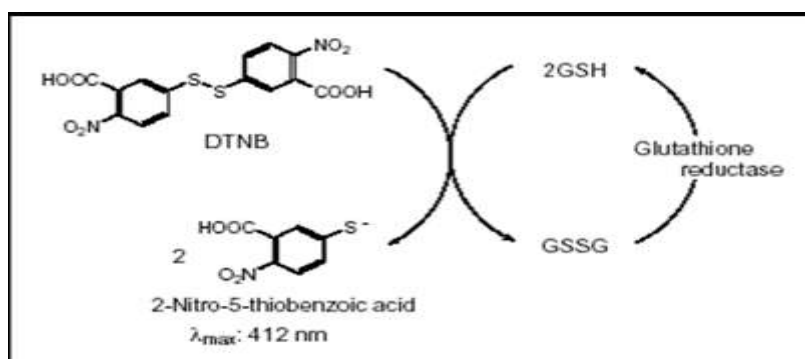
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinetal, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengupta, A., et al., 2004).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy., Y.N., 2004).



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



Εικόνα 9: Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7,95). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.

- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35

- **Κιτρικό Νάτριο**. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Πίνακας 3: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Αιμόλυμα	-	20 μL

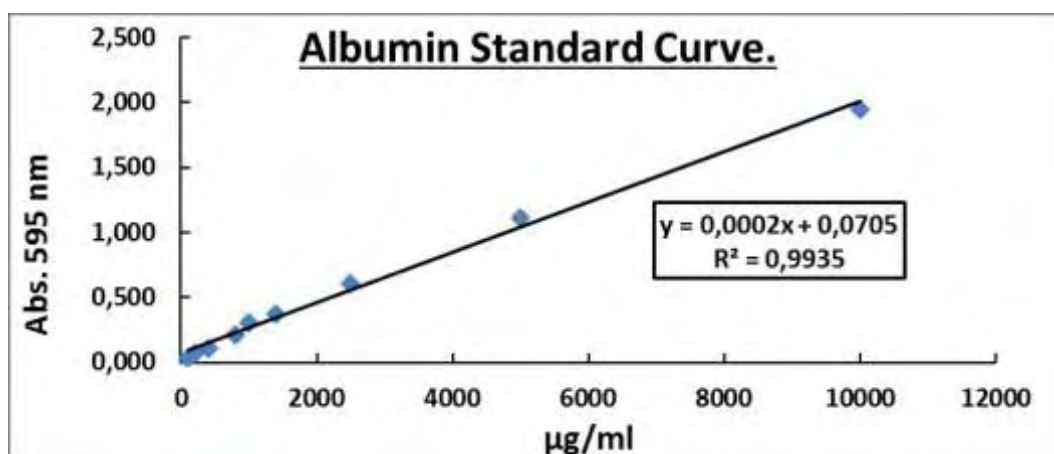
Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Φυγοκεντρούμε στα 15.000g για 5 min στους 5°C και τέλος μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (Roland., F., et al., 1952).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μmol/mg total prot.) = (Absδείγματος - Δabstυφλού/13,6) × 2 × 3 (λόγω αραιώσεων) × 50,5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50,5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (20μL) (1010/20=50,5), πολλαπλασιάζουμε με 2 (αραίωση που έγινε από το TCA 5%) και πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης* του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με εξίσωση $y=0,0002x + 0,0705$ και $R^2= 0,9935$, όπου ο άξονας $y = \text{Abs στα } 595 \text{ nm}$ και ο $x = \text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)}$. Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.



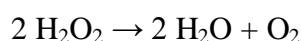
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

2. Δραστηκότητα της καταλάσης

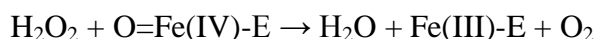
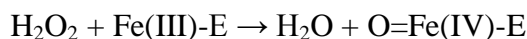
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίου υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani., P., et al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεταμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon., E., et al., 2007). Στο τεταμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο.

Αρχή της μεθόδου

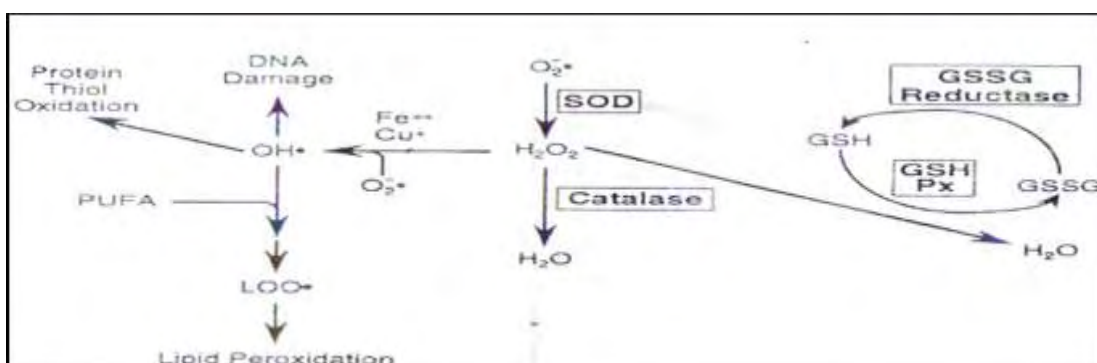
Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 10: Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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

CAT



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

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 67mM (pH 7,4)MB** (KH_2PO_4): 136 και **MB** (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphatebuffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4,77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7,4.

- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)**. Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της καταλάσης

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός (αραίωση πάλι) 1 μέρος ομογενοποιημένου ιστού με 2 μέρη PBS.	40 μL

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε

το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφύλι στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40$) \times (75 \times 1000 \times 3 \times 3) / Conc. Protein (mg/mL). Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του δείγματος (40 μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Πολλαπλασιάζουμε πάλι με 3, για να συνυπολογίσουμε την νέα αραίωση που έγινε στην μέθοδο.

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

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

3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

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

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

Αρχή της μεθόδου

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

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7,4).** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0,712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,4.

- **DPPH 0,1 mM.** MB: 394,32. Διαλύουμε 0,02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19,8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	460 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-
Ιστός Ομογενοποιημένος (αραίωση πάλι) 1 μέρος ομογενοποιημένου ιστού με 4 μέρη PBS.	-	-	40 μL

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

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

ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5] / 1000.$

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

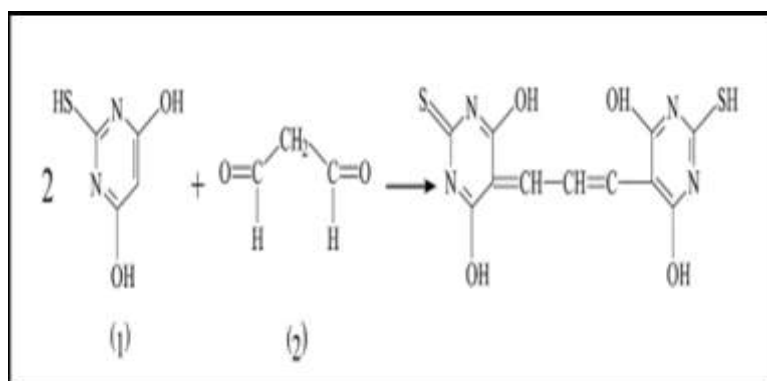
- γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια (1000 μ L στην κυψελίδα / 40 μ L ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).
- δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται κατά τη μέτρηση.
- ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Αρχή της μεθόδου

Τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 11: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

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

Αντιδραστήρια

- **Tris-HCl 200 mM (pH 7,4).** MB (Tris): 121,14. MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10,1 N]. Για να παρασκευάσουμε \approx 100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0,1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0,61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0,42 mL του stock 37% HCl (10,1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7,4.

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

- **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144,1 και MB (Na₂SO₄): 142,04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / $0,156 \times 31$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου ($3.100 \mu\text{L}$) με τον όγκο του πλάσματος ($100 \mu\text{L}$) ($3,100 / 100 = 31$). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι $156.000 (\text{mol/L})$ διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to $\mu\text{mol/L}$.

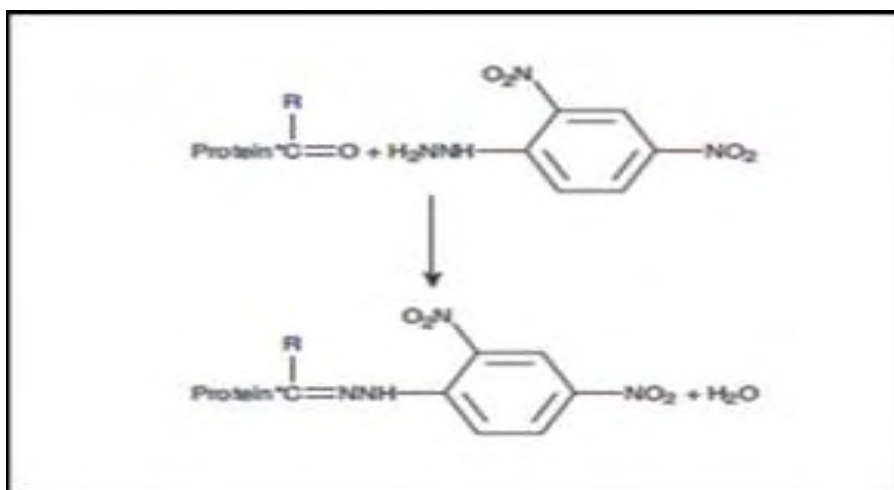
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L .

5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

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

Αρχή της μεθόδου

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



Εικόνα 12: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου

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

Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα HCl 2,5 N.** HCl: MB 36,46; stock 37% (10,1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2,5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24,6 mL του 37% HCl (ίσο με 10,1 N HCl) σε \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- **DNPΗ 14 mM** (MB: 198,1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPΗ διαλύουμε 0,2833 g DNPΗ σε 100 mL 2,5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το

ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0,5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2,3)** (MB: 60,06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2,3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in \approx 70 mL αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε 50 μ L πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

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

Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0,5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCl) για τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 N HCl για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C.

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

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0,5 mL αιθανόλης και 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2,3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

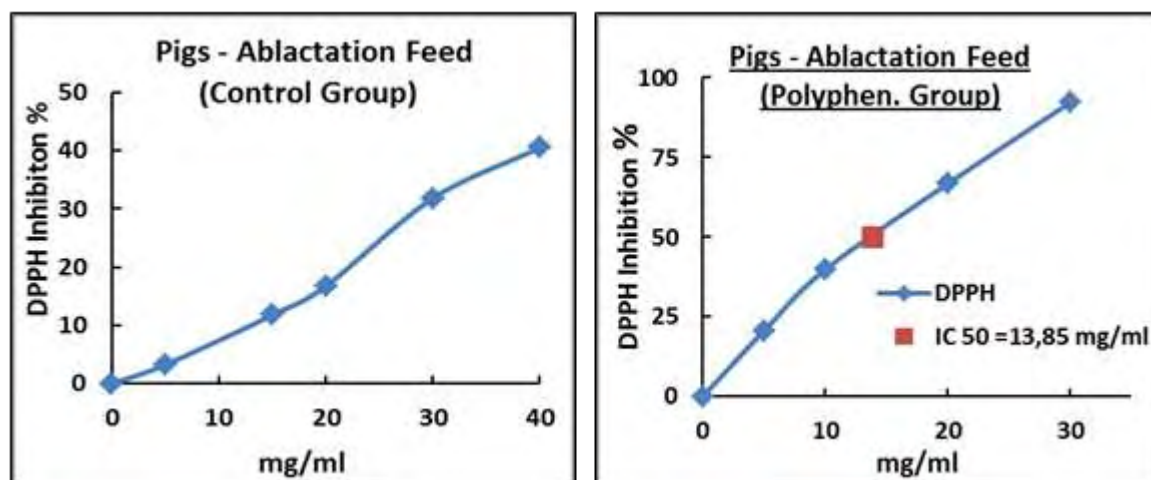
*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0,5 mL DNPΗ, τα οποία αντικαθίστανται 0,5 mL HCL 2,5 N).

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος – Ατυφλού / $0,022 \times 1.000/50 \times 2$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι 22 mM x cm⁻¹. Το 1.000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1.000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Χ 2 διότι προσθέτουμε (αραιώση 1/1 TCA 20% αρχικά).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά, για να ελέγξουμε την αντιοξειδωτική δράση των σιτηρεσίων των ομάδων, τόσο μεμονωμένα όσο και μεταξύ τους, εκτελέσαμε τη μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα αυτής της μέτρησης φαίνονται παρακάτω.

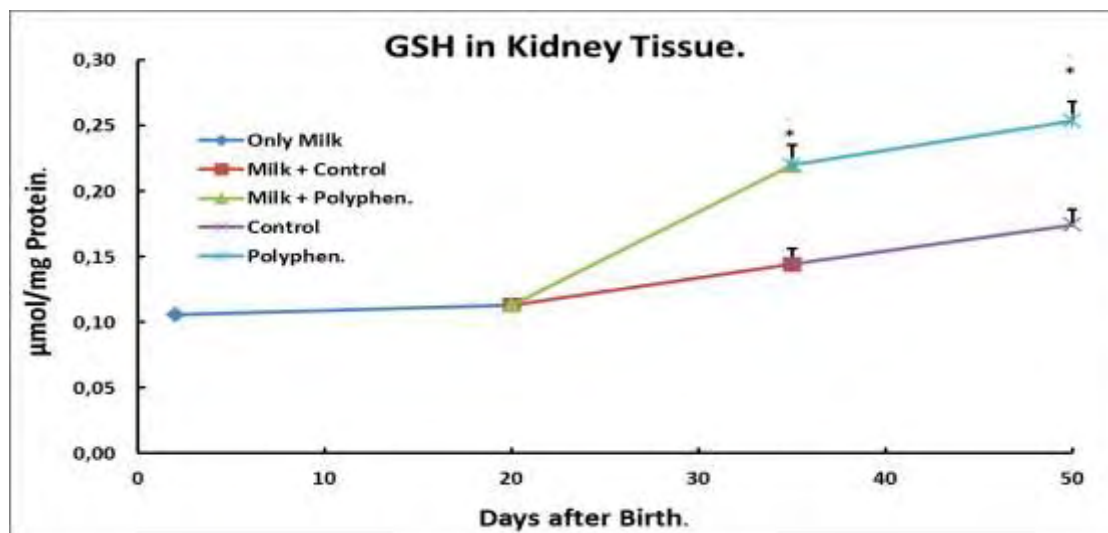


Διάγραμμα 2: Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων

Παρατηρείται ότι ενώ στο σιτηρέσιο της ομάδας ελέγχου ακόμα και στα 40mg/ml η αναστολή της ρίζας είναι στα 40,52%, στο σιτηρέσιο της ομάδας με τα πολυφαινολικά πρόσθετα το IC₅₀ της ρίζας επιτυγχάνεται στα 13,85 mg/ml. Αυτό σημαίνει ότι το σιτηρέσιο της ομάδας που καταναλώνει τα πολυφαινολικά πρόσθετα εμφανίζει περίπου τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση από αυτό της ομάδας ελέγχου.

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε * $p < 0,05$.

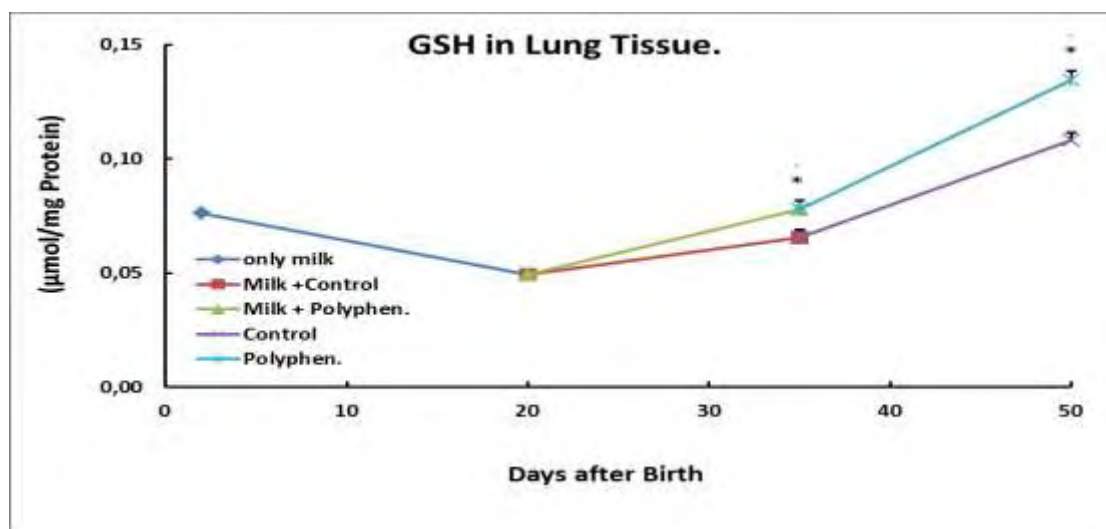
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους τρεις ιστούς των χοιριδίων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, (νεφρικός, πνευμονικός, τετρακέφαλος) φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 3: GSH στο Νεφρικό ιστό

Πίνακας 6: Αύξηση GSH στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

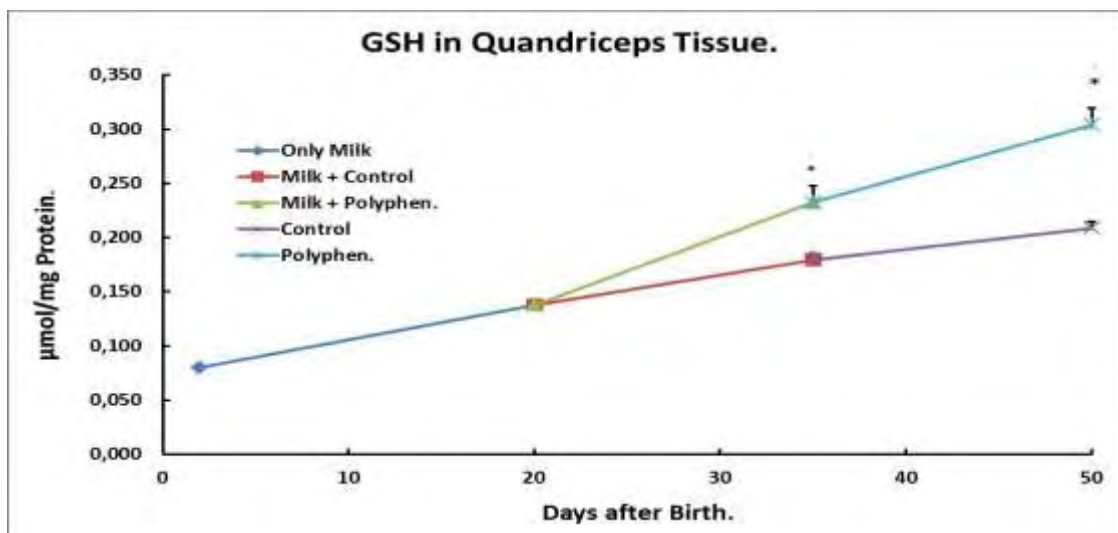
Νεφρικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % GSH στην πολυφαινολική ομάδα	51,72	45,98



Διάγραμμα 4: GSH στον Πνευμονικό ιστό

Πίνακας 7: Αύξηση GSH στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

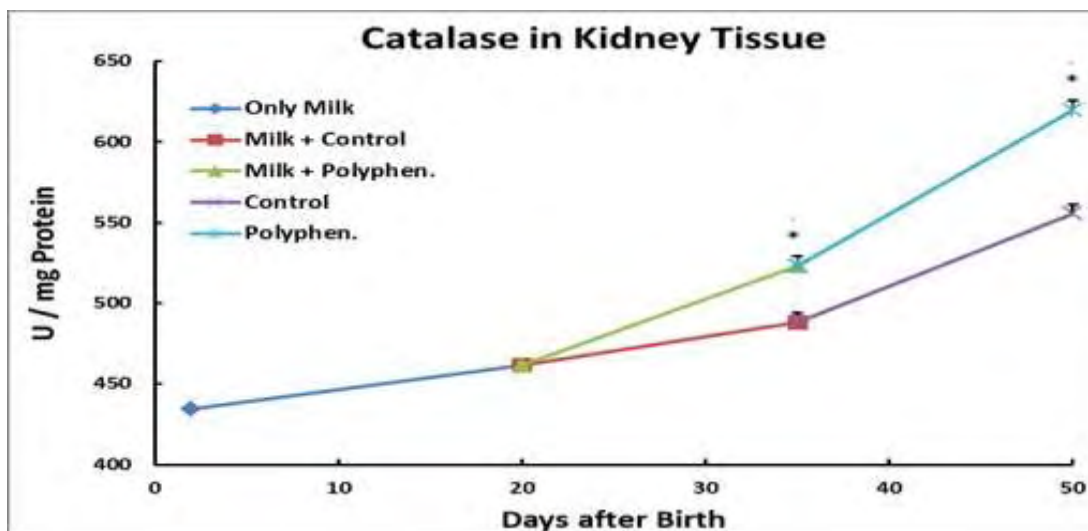
Πνευμονικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % GSH στην πολυφαινολική ομάδα	18,18	25,00



Διάγραμμα 5: GSH στον τετρακέφαλο

Πίνακας 8: Αύξηση GSH στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

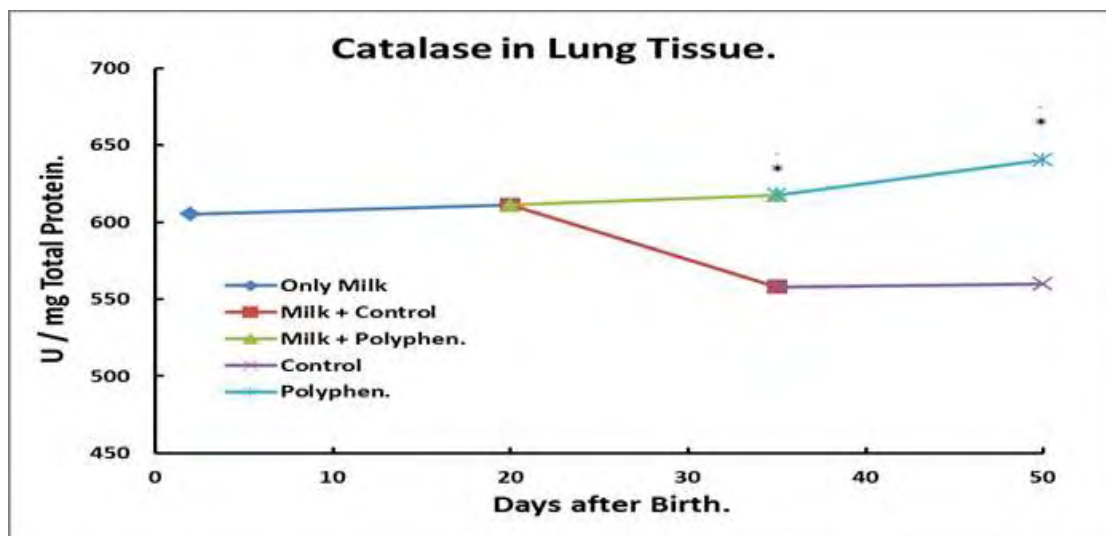
Τετρακέφαλος	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % GSH στην πολυφαινολική ομάδα	30,17	45,45



Διάγραμμα 6: Καταλάση στο Νεφρικό ιστό

Πίνακας 9: Αύξηση Καταλάσης στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

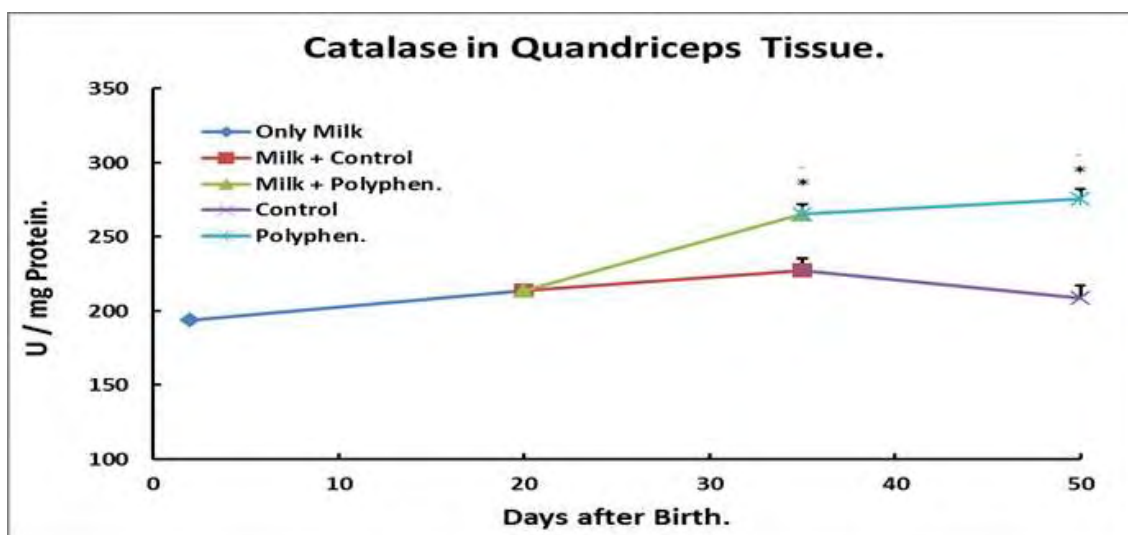
Νεφρικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % Καταλάσης στην πολυφαινολική ομάδα	7,16	11,54



Διάγραμμα 7: Καταλάση στον Πνευμονικό ιστό

Πίνακας 10: Αύξηση Καταλάσης στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

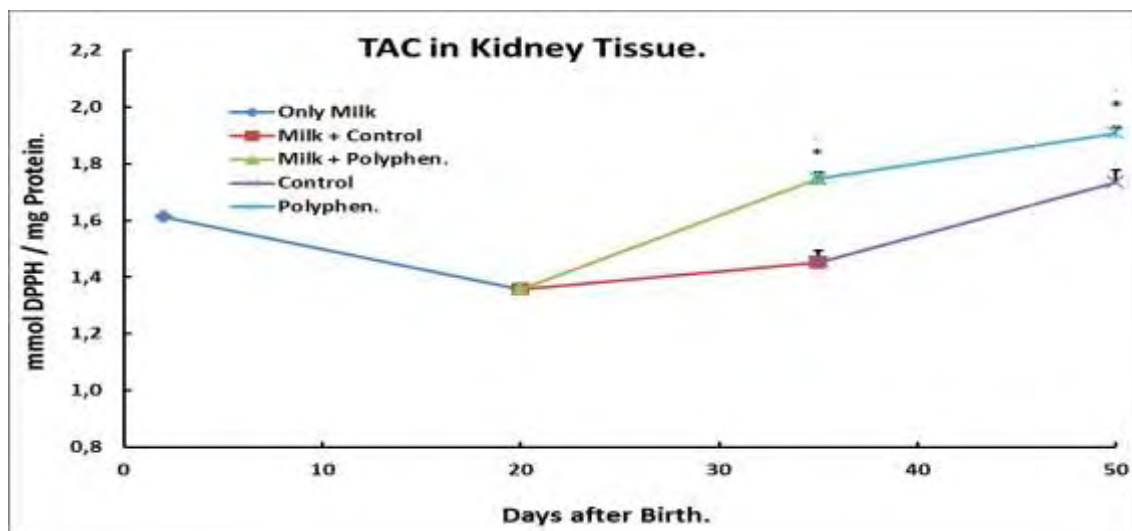
Πνευμονικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % Καταλάσης στην πολυφαινολική ομάδα	10,70	14,40



Διάγραμμα 8: Καταλάση στον Τετρακέφαλο

Πίνακας 11: Αύξηση Καταλάσης στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

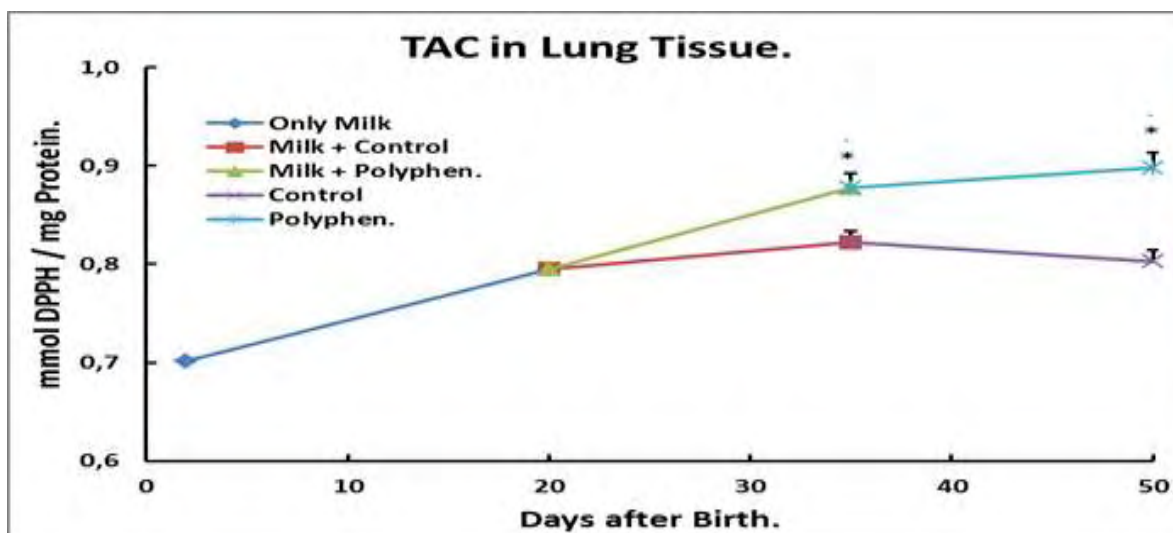
Τετρακέφαλος	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % Καταλάσης στην πολυφαινολική ομάδα	16,78	32,08



Διάγραμμα 9: TAC στο Νεφρικό ιστό

Πίνακας 12: Αύξηση TAC στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

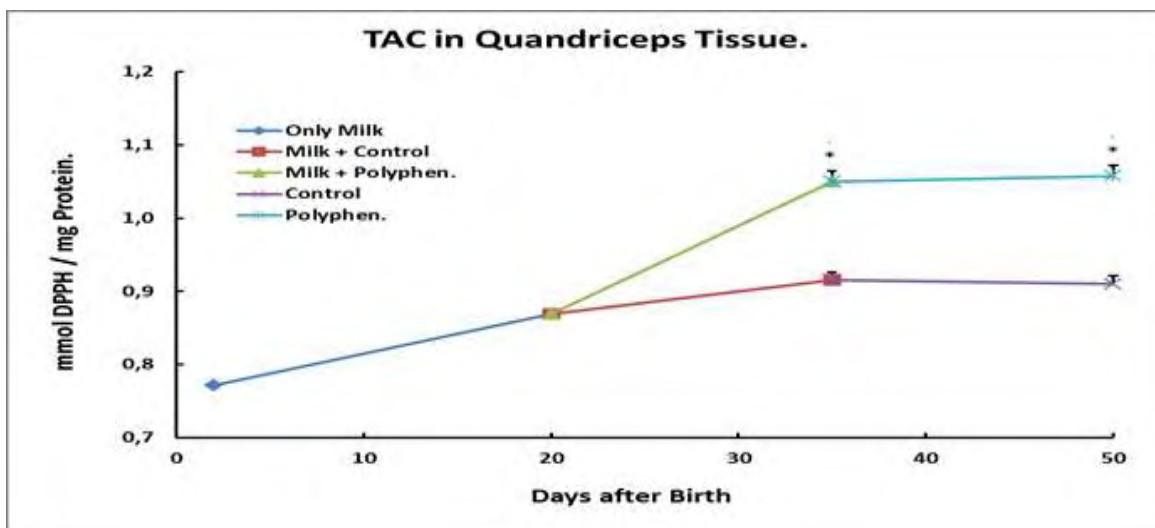
Νεφρικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % TAC στην πολυφαινολική ομάδα	20,39	9,91



Διάγραμμα 10: TAC στον Πνευμονικό ιστό

Πίνακας 13: Αύξηση TAC στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

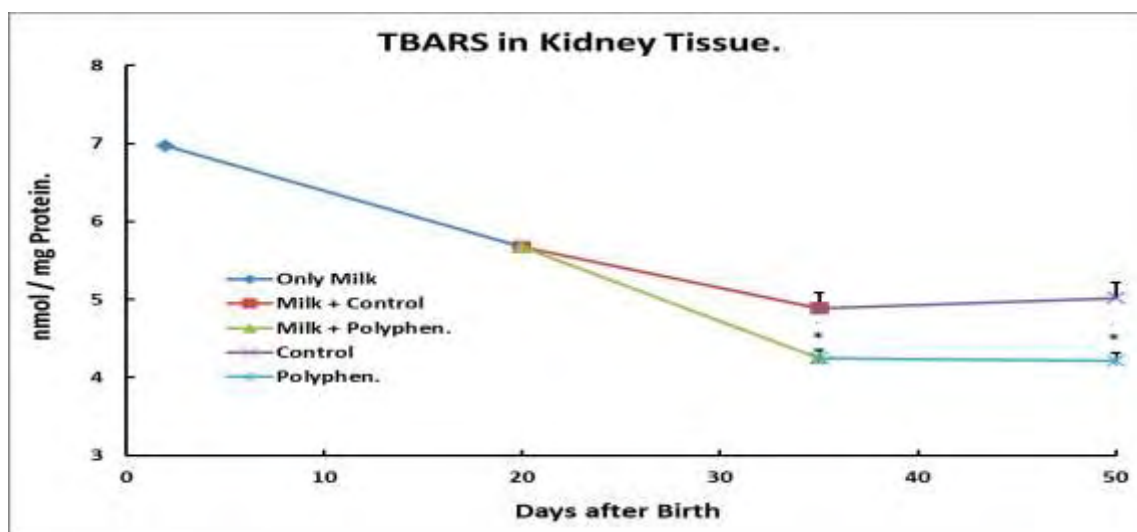
Πνευμονικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % TAC στην πολυφαινολική ομάδα	6,81	11,83



Διάγραμμα 11: TAC στον Τετρακέφαλο

Πίνακας 14: Αύξηση TAC στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

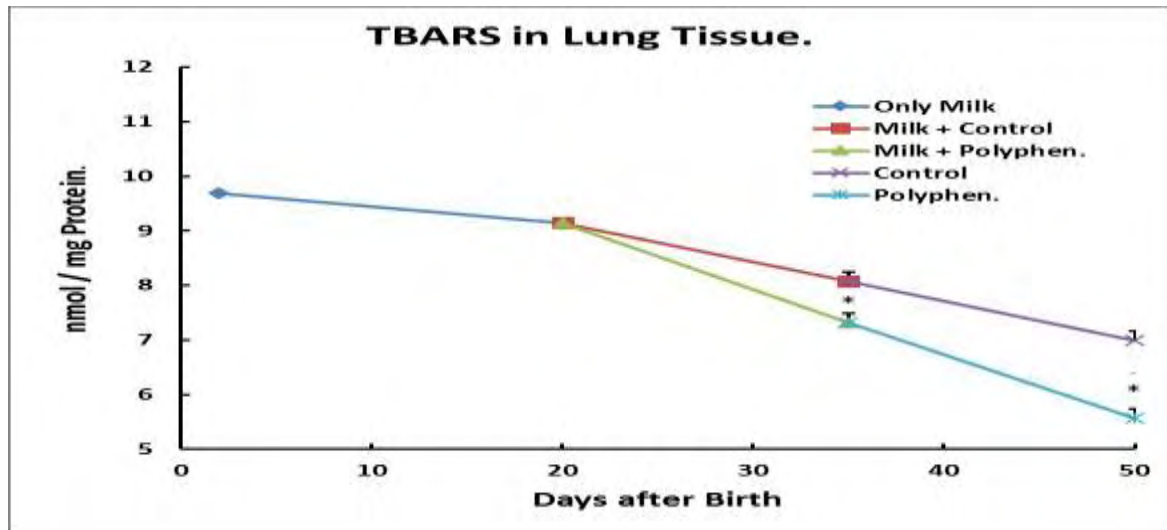
Τετρακέφαλος	35 μέρες	50 μέρες
Αύξηση % TAC στην πολυφαινολική ομάδα	14,75	16,15



Διάγραμμα 12: TBARS στο Νεφρικό ιστό

Πίνακας 15: Μείωση TBARS στο Νεφρικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

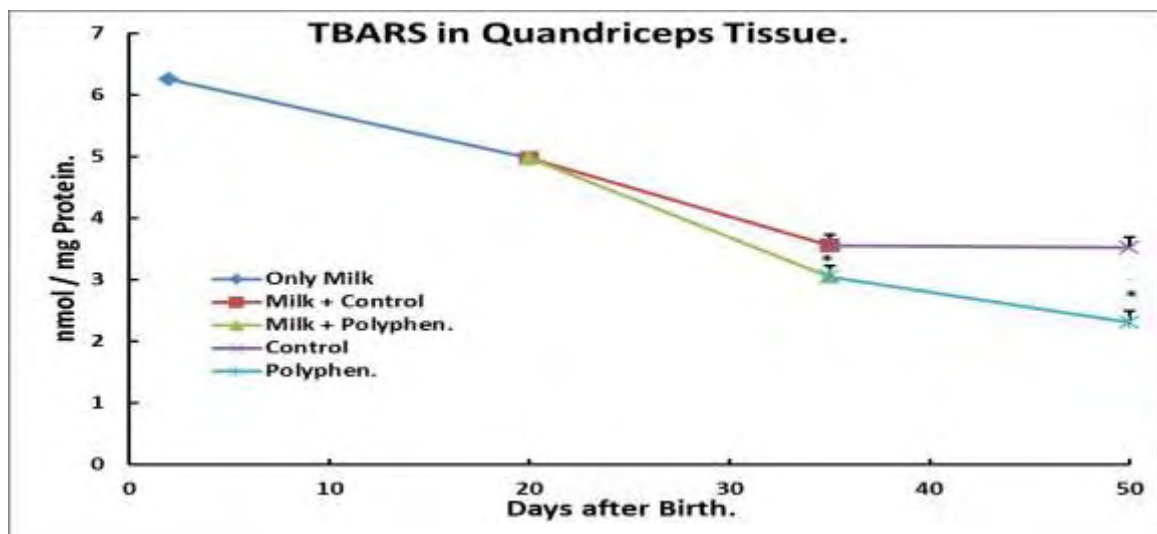
Νεφρικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % TBARS στην πολυφαινολική ομάδα	13,10	16,03



Διάγραμμα 13: TBARS στον Πνευμονικό ιστό

Πίνακας 16: Μείωση TBARS στον Πνευμονικό ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

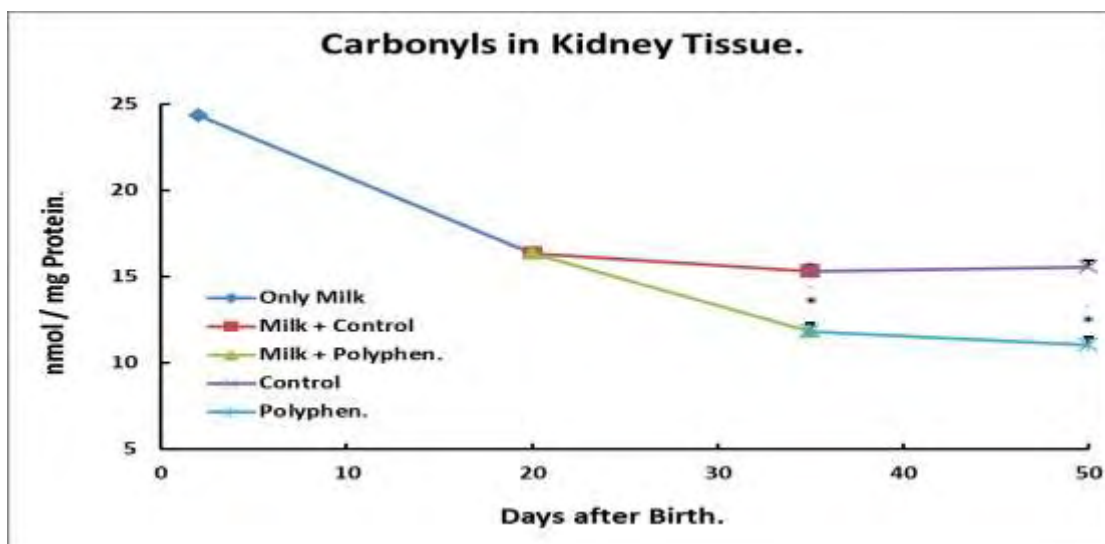
Πνευμονικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % TBARS στην πολυφαινολική ομάδα	9,39	20,38



Διάγραμμα 14: TBARS στον Τετρακέφαλο

Πίνακας 17: Μείωση TBARS στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

Τετρακέφαλος	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % TBARS στην πολυφαινολική ομάδα	14,27	34,55

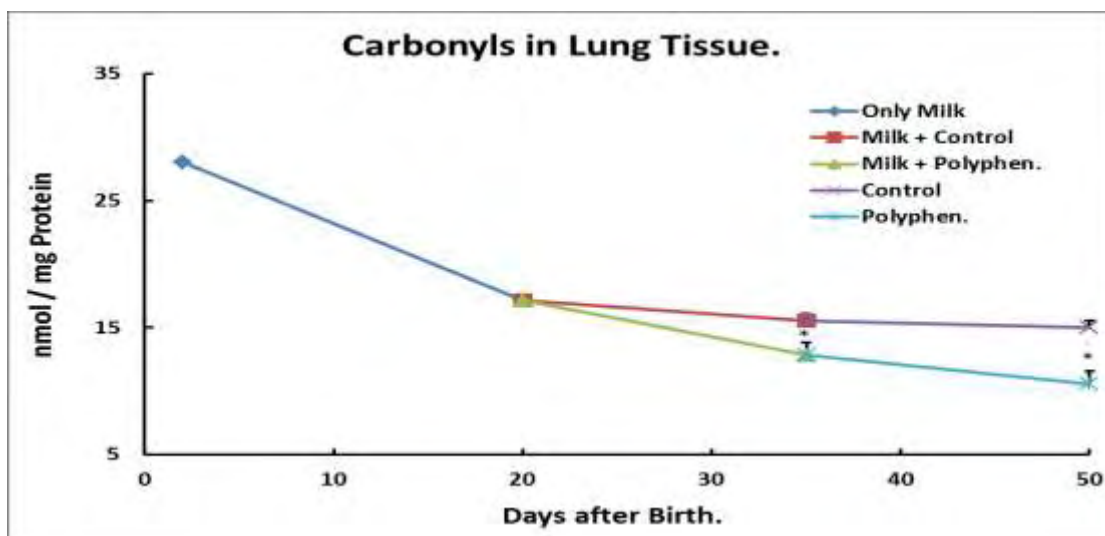


Διάγραμμα 15: Καρβονύλια στο Νεφρικό ιστό

Πίνακας 18: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Νεφρικό ιστό της

Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

Νεφρικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % Καρβονυλίων στην πολυφαινολική ομάδα	22,77	29,08

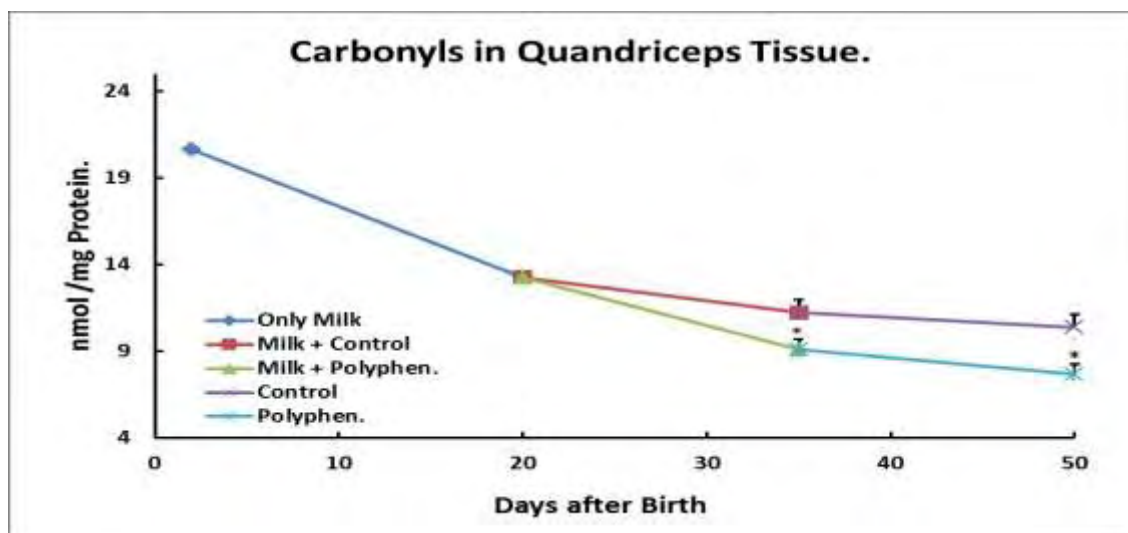


Διάγραμμα 16: Καρβονύλια στον Πνευμονικό ιστό

Πίνακας 19: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Πνευμονικό ιστό της

Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

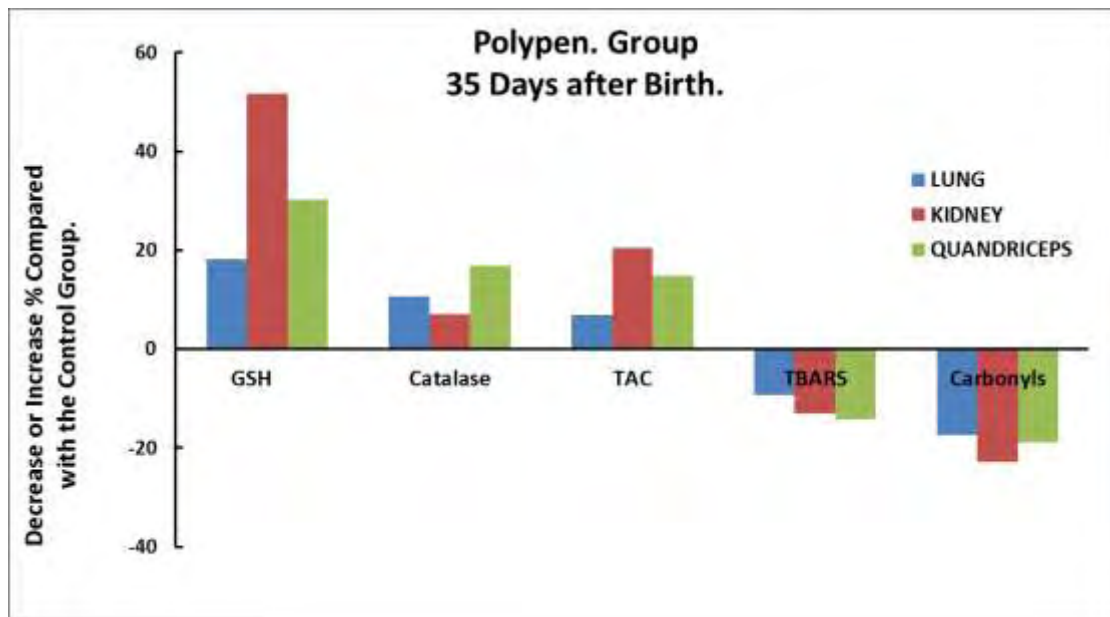
Πνευμονικός ιστός	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % Καρβονυλίων στην πολυφαινολική ομάδα	17,37	29,74



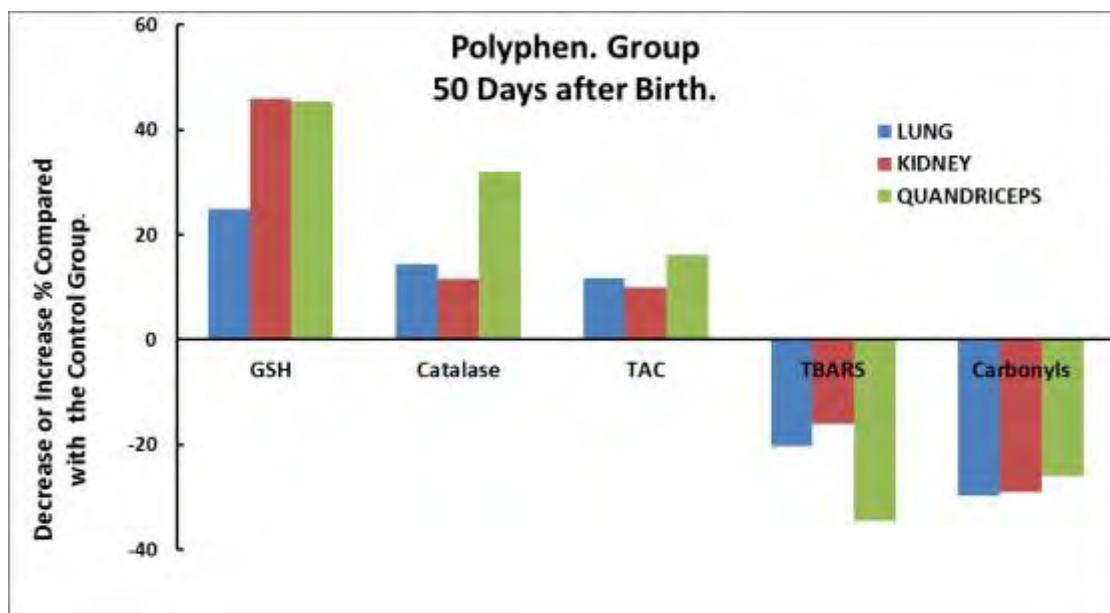
Διάγραμμα 17: Καρβονύλια στον Τετρακέφαλο

Πίνακας 20: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Τετρακέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

Τετρακέφαλος	35 μέρες	50 μέρες
Μείωση % Καρβονυλίων στην πολυφαινολική ομάδα	18,93	26,08



Διάγραμμα 18: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες (Ηλικία 35 Ημερών)



Διάγραμμα 19: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες (Ηλικία 50 Ημερών)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής τα οποία, ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν, εκτρέφονταν με διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα που αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, τρέφονταν με το βασικό σιτηρέσιο ενώ η δεύτερη τρέφονταν με σιτηρέσιο που περιλάμβανε πολυφαινολικά πρόσθετα από το κατακράτημα επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Συνολικά εικοσιέξι (26) χοιρίδια χρησιμοποιήθηκαν στα οποία έγιναν τέσσερις (4) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, συγκεκριμένα: στις δύο (2), είκοσι (20), τριάντα πέντε (35) και πενήντα (50) ημέρες από τη γέννησή τους. Πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι και την εικοστή (20) ημέρα από τη γέννηση, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε μετά την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα από τη γέννηση τους.

Οι ιστοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ο νεφρικός, ο πνευμονικός και ο τετρακέφαλος ιστός των νεαρών χοιριδίων. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν παραπάνω, μπορεί να γίνει αξιολόγηση ανάλογα με τον δείκτη που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χοιριδίων στους τρεις ιστούς υπό μελέτη. Ξεκινώντας, μπορούμε να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε κάθε έναν ιστό από τους τρεις (3) που μελετήθηκαν συνολικά (νεφρικό, πνευμονικό, τετρακέφαλο). Αρχικά, όσον αφορά το νεφρικό ιστό, μπορούμε να δούμε μια αύξηση στις τιμές της GSH από την ημέρα του απογαλακτισμού, δηλαδή την εικοστή (20) ημέρα, μέχρι την πενήντα (50) και στις δύο (2) ομάδες. Επίσης, το ίδιο συμβαίνει και στους άλλους δύο (2) ιστούς, τον πνευμονικό και τον τετρακέφαλο. Μετά την εικοστή μέρα δηλαδή, αυξάνεται η τιμή της GSH τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην πολυφαινολική ομάδα.

Βέβαια, φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι στην πολυφαινολική ομάδα, υπάρχει μεγαλύτερη αύξηση στις τιμές της GSH κάτι που δείχνει το θετικό αποτέλεσμα στη χρήση των πολυφαινολών από Υ.Α.Ε. Συγκεκριμένα, στο νεφρικό ιστό την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα παρατηρείται μία αύξηση κατά 51,72% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ενώ την πενηκοστή (50) μέρα κατά 45,98%, σε σχέση πάντα με την ομάδα ελέγχου. Στον πνευμονικό ιστό, η αύξηση στην τιμή της GSH την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα αγγίζει το 18,18% ενώ την πενηκοστή (50) το 25% σε σχέση με την πρώτη ομάδα η οποία αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Στον τρίτο ιστό ο οποίος είναι ο τετρακέφαλος, παρατηρείται το ίδιο με αυξήσεις κατά 30,17% και 45,45% της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις αντίστοιχες ημέρες. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στο νεφρικό ιστό κατά 45,98%. Τα δεδομένα αυτά όσον αφορά την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), υποδεικνύουν ότι τα πολυφαινολικά πρόσθετα που προέρχονται από τα υποπροϊόντα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε.) και αποτέλεσαν μέρος του σιτηρεσίου για τη δεύτερη ομάδα, έχουν θετικό αποτέλεσμα καθώς η αύξηση στην τιμή της GSH συνεπάγεται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό αποτελεί ευνοϊκό γεγονός για την υγεία των νεαρών χοιριδίων καθώς έτσι ενισχύεται η αντιοξειδωτική τους άμυνα.

Συνεχίζοντας με την αξιολόγηση από τις μετρήσεις για τη δραστηριότητα της καταλάσης, φαίνεται πως σε όλους τους ιστούς και στις δύο (2) ομάδες υπήρχε αύξηση στην τιμή της. Συγκεκριμένα, στο νεφρικό ιστό στις τριάντα πέντε (35) ημέρες παρατηρείται μία αύξηση 7,16% και στις πενήντα ημέρες (50) μία μεγαλύτερη αύξηση κατά 11,54%. Στον πνευμονικό ιστό στις τριάντα πέντε (35) ημέρες παρουσιάζεται αύξηση 10,70% ενώ στις πενήντα ημέρες ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της τάξεως του 14,40%. Τέλος στον τετρακέφαλο ιστό παρουσιάστηκε αύξηση στις τριάντα πέντε (35) και στις πενήντα (50) ημέρες κατά 16,78% και 32,08% αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον τετρακέφαλο ιστό κατά 32,08%. Τα αυξημένα αποτελέσματα της πολυφαινολικής ομάδας και στους τρεις (3) ιστούς υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου ενισχύεται σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης,

παρουσίασε αύξηση και στους τρεις (3) ιστούς τόσο στις τριανταπέντε (35), όσο και στις πενήντα (50) ημέρες μετά τη γέννηση των νεαρών χοιριδίων. Συγκεκριμένα, στο νεφρικό ιστό, η αύξηση που παρατηρήθηκε στο ποσοστό TAC της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου είναι 20,39% και 9,91% αντίστοιχα. Στον πνευμονικό ιστό, στις τριανταπέντε (35) ημέρες εμφανίστηκε μία αύξηση της τάξεως του 6,81% ενώ στις πενήντα (50) ημέρες η αύξηση ήταν μεγαλύτερη φτάνοντας στο 11,83%. Στον τρίτο και τελευταίο ιστό, τον τετρακέφαλο, η αύξηση στις τριανταπέντε (35) και στις πενήντα (50) ημέρες αξιολογήθηκε στο 14,75% και 16,15% αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον τετρακέφαλο ιστό κατά 16,15%. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο των πολυφαινολών από τα Υ.Α.Ε. οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ομάδων χοιριδίων στις οποίες χορηγούνται.

Όσον αφορά στις ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), παρατηρείται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει μείωση των TBARS στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τριανταπέντε (35) ημέρες μετά τη γέννηση υπάρχει μείωση 13,10% στο νεφρικό ιστό ενώ στις πενήντα (50) ημέρες 16,03%. Για τις αντίστοιχες ημέρες στον πνευμονικό ιστό παρατηρείται μείωση 9,39% και 20,38%. Τέλος, στον τετρακέφαλο και για τις ίδιες ημέρες πάντα εμφανίστηκε μείωση 14,27% και 34,55% αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη μείωση πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον τετρακέφαλο ιστό κατά 34,55%. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η πολυφαινολική ομάδα και στους 3 ιστούς παρουσιάζει μειωμένες τιμές στα TBARS, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μικρότερη οξειδωση στα λιπίδια.

Ο τελευταίος δείκτης ο οποίος μελετήθηκε είναι τα καρβονύλια τα οποία δείχνουν την οξειδωση των πρωτεϊνών. Η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την πολυφαινολική ομάδα, ενώ η τελευταία, μειώνει συνεχώς την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Ξεκινώντας με τα αποτελέσματα για το νεφρικό ιστό παρατηρείται μείωση των καρβονυλίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η οποία φτάνει το 22,77% στις τριανταπέντε (35) μετά τη γέννηση, ενώ μειώνεται ακόμα περισσότερο στις πενήντα (50) ημέρες φτάνοντας στο 29,08%. Στον πνευμονικό ιστό στις τριάντα

πέντε (35) ημέρες παρατηρείται μία μείωση 17,37% στην οξειδωση των πρωτεϊνών και στις πενήντα ημέρες (50) μία μεγάλη μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών κατά 29,74%. Στον τετρακέφαλο, η μείωση του ποσοστού των καρβονυλίων στην πολυφαινολική ομάδα αγγίζει το 18,93% στις τριάντα πέντε (35) ημέρες και το 26,08% στις πενήντα (50). Η μεγαλύτερη μείωση πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον πνευμονικό ιστό κατά 29,74%. Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι στο σύνολο των τριών (3) ιστών, η πολυφαινολική ομάδα εμφανίζει μειωμένη οξειδωση πρωτεϊνών, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, καταλήγουμε πως η εισαγωγή στο σιτηρέσιο των νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, πολυφαινολικών πρόσθετων που προέρχονται από τα υποπροϊόντα (κατακράτημα), επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου, βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των χοιριδίων, στην περίοδο του απογαλακτισμού. Στους τρεις (3) ιστούς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι γεγονός πως από τις μετρήσεις και των πέντε (5) δεικτών εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα από τα Υ.Α.Ε. έχουν ικανή αντιοξειδωτική δράση. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα αποτελέσματα της μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, τα οποία φανερώνουν τη δράση των πολυφαινολικών προσθέτων ως αντιοξειδωτικά. Για παράδειγμα, στην ηλικία των πενήντα (50) ημερών τα αποτελέσματα για τη μέτρηση της TAC ήταν 9,91%, 11,83% και 16,15% αυξημένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στο νεφρικό, πνευμονικό και τετρακέφαλο ιστό αντίστοιχα. Επίσης, σύμφωνα με τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε για την οξειδωση των λιπιδίων, βρέθηκε ότι οι τιμές για την πολυφαινολική ομάδα ήταν 16,03%, 20,38% και 34,55% χαμηλότερες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την πεντηκοστή (50) ημέρα, κάτι που συνεπάγεται ότι τα πολυφαινολικά πρόσθετα στο σιτηρέσιο της δεύτερης ομάδας, υποβοήθησαν κατά πολύ την έντονη μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων. Εκτός από τις μειωμένες τιμές για την οξειδωση των λιπιδίων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπήρξαν μειωμένες τιμές και για την οξειδωση των πρωτεϊνών στην πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου την πεντηκοστή (50) ημέρα. 29,08% για το νεφρικό ιστό, 29,74% για τον πνευμονικό ιστό και 26,08% για τον τετρακέφαλο. Αυτά είναι τα ποσοστά μείωσης της οξειδωσης των πρωτεϊνών σε σχέση με τις τιμές της

ομάδας ελέγχου. Τέλος, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως ενδογενές αντιοξειδωτικό, εμφανίζει αυξημένες τιμές κατά 45,98%, 25% και 45,45% οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που σημαίνει ότι στα χοιρίδια η χορήγηση πολυφαινολικού σιτηρεσίου αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν το γεγονός ότι τα πολυφαινολικά πρόσθετα από Υ.Α.Ε. τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως σιτηρέσιο στη δεύτερη ομάδα των χοιριδίων, αύξησαν την αντιοξειδωτική λειτουργία του οργανισμού. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι εμφανής μετά από τη μελέτη και των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες και αυτό δείχνει ότι η απομόνωση των πολυφαινολών από τα Υ.Α.Ε. θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για χρήση τους μετά από επεξεργασία στο σιτηρέσιο κάποιων ζώων για τη βελτίωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δείχνουν για πρώτη φορά ότι οι ζωοτροφές που περιέχουν πολυφαινόλες και που προέρχονται από τα υποπροϊόντα επεξεργασίας αποβλήτων ελαιοτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χοιριδίων με την μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλαδή την οξείδωση των πρωτεϊνών, την υπεροξείδωση των λιπιδίων) και την αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. δραστηριότητα της καταλάσης, γλουταθειόνης και τα επίπεδα της TAC). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, το πολυφαινολικό σιτηρέσιο θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άλλα εκτρεφόμενα ζώα ή ακόμα και σε ανθρώπινες τροφές. Η χρήση αυτή θα μπορούσε επίσης να είναι μια καλή λύση για τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα λύματα των ελαιοτριβείων.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aebi, H. *Catalase in vitro*. *Methods Enzymol*, 1984.
2. Andras Perl., *Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus*, 2013.
3. B. Poljsak. *Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress*, 2011.
4. Bogani, P.; Galli, C.; Villa, M.; Visioli, F., *Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil*. *Atherosclerosis*, 2007.
5. Boon E M, Downs A and Marcey D. *Proposed Mechanism of Catalase In Catalase: H2O2: H2O2 Oxidoreductase*, 2007.
6. Bravo L, *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance*, *Nutrition Rev*, 1998.
7. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., *Diversity of structures and properties among catalases*, 2004.
8. Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S.J., *Chemistry and health of olive oil phenolics*. *Crit. Review. Food Sci. Nutrition*, 2009.
9. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. *Fed. Am. Soc. Exper. Biology*, 2003.
10. Covas, M.I.; Nyyssonen, K.; Poulsen, H.E.; Kaikkonen, J.; Zunft, H.J.; Kiesewetter, H.; Gaddi, A.; de la Torre, R.; Mursu, J.; Baumler, H.; Nascetti, S.; Salonen, J.T.; Fito, M.; Virtanen, J.; Marrugat, J.; Group, E.S., *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial*. *Ann. Int. Medicine*, 2006.
11. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD, *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*, 2004.
12. Durackova Z., *Some Current Insights info Oxidative Stress*. *Physiol Res*, 2010.
13. Evan, G.I.; Vousden, K.H. *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*, *Nature*, 2001.
14. Farrukh Aqil, Radha Munagala, Manicka V. Vadhanam, Hina Kausar, Jeyaprakash Jeyabalan, David J. Schultz, and Ramesh C., *Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk*, 2012.

15. Fito, M.; Cladellas, M.; de la Torre, R.; Marti, J.; Alcantara, M.; Pujadas-Bastardes, M.; Marrugat, J.; Bruguera, J.; Lopez-Sabater, M.C.; Vila, J.; Covas, M.I. **Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial.** *Atherosclerosis*, 2005.
16. Gordon, T.; Kannel, W.B.; Castelli, W.P.; Dawber, T.R., **Lipoproteins, cardiovascular disease, and death.** *The Framingham study.* *Arch. Intern. Medicine*, 1981.
17. Guiso M, Marra C., **Highlights in oleuropein aglycone structure,** *Natural Product Res.*, 2005.
18. Halliwell B. **Biochemistry of oxidative stress,** *Biochem Soc Trans*, 2007.
19. Halliwell B., **Biochemistry of oxidative stress,** 2007.
20. Halliwell B, Gutteridge JM., **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease,** 1990.
21. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al, **Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study,** 1995.
22. Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J., *Naturforsch*, 2003.
23. Janero DR., **Therapeutic potential of vitamin-E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis.** *Free Radic Biol Med*, 1991.
24. John H Hart. Hillis W.E., **Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in eucalyptus sideroxylon,** 1974.
25. Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M., **Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis,** 2001.
26. 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,** 2001.
27. Medina, E.; de Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M. **Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity,** *Food Chemistry*, 2006.
28. Naghma Khan and Hasan Mukhtar, **Tea polyphenols for health promotion,** 2007.
29. Nicolaiew, N.; Lemort, N.; Adorni, L.; Berra, B.; Montorfano, G.; Rapelli, S.; Cortesi, N.; Jacotot, B., **Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid**

- rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. Ann. Nutrition. Metabolism, 1998.*
30. Papadopoulos GK, Boskou D: "**Antioxidant effect of natural phenols on olive oil**", *J. Am. Oil Chemistry, 1991.*
 31. Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. **Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification**, 2003.
 32. 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**, 2004.
 33. Patsoukis N., **The role of thiol situation in sclerotial differentiation of fungi**, 2006.
 34. Quideau, S. P.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C. L.; Pouységu, L., **Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis**, 2011.
 35. Ramirez-Tortosa, C.; Lopez-Pedrosa, J.M.; Suarez, A.; Ros, E.; Mataix, J.; Gil, A. **Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. Br. J. Nutrition, 1999.**
 36. Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. **Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients**, 2004.
 37. Reinisch, N.; Kiechl, S.; Mayr, C.; Schratzberger, P.; Dunzendorfer, S.; Kahler, C.M.; Buratti, T.; Willeit, J.; Wiedermann, C.J., **Association of high plasma antioxidant capacity with new lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study, Eur. J. Clin. Invest, 1998.**
 38. Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. **A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase**, 1952.
 39. Salvini, S.; Sera, F.; Caruso, D.; Giovannelli, L.; Visioli, F.; Saieva, C.; Masala, G.; Ceroti, M.; Giovacchini, V.; Pitozzi, V.; Galli, C.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Bortolomeazzi, R.; Dolara, P.; Palli, D. **Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. Br. J. Nutrition, 2006.**
 40. Sandhya Khurana, Krishnan Venkataraman, Amanda Hollingsworth, Matthew Piche, and T. C. Tai, **Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging**, 2013.
 41. Sara Cicerale et al. **Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil**, 2010.

42. Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. *Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview*, 2004.
43. Sies, H. *Oxidative Stress*. London: Academic; 1985.
44. Stefanie J. W. H. Oude Elferink, Frank Driehuis, Jan C. Gottschal and Sierk F. Spoelstra, *Silage fermentation processes and their Manipulation.*, 2008
45. Sukhsatej Batra, *Phenols in Extra Virgin Olive Oil Inhibit Colon Cancer Cell Growth*, *oliveoiltimes*, 2014.
46. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J of Biochem & Cell Biol*, 2007.
47. Vera Dias. *The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease*, 2013.
48. Visioli F, Bellomo G, Galli C: "*Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*", *Biochem. Biophys*, 1998.
49. Visioli, F.; Caruso, D.; Grande, S.; Bosisio, R.; Villa, M.; Galli, G.; Sirtori, C.; Galli, C., *Virgin Olive Oil Study: Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients*, *Eur. J. Nutrition* 2005.
50. Vissers, M.N.; Zock, P.L.; Wiseman, S.A.; Meyboom, S.; Katan, M B. *Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers*. *Eur. J. Clin. Nutrition*, 2001.
51. Weinbrenner, T.; Fito, M.; de la Torre, R.; Saez, G.T.; Rijken, P.; Tormos, C.; Coolen, S.; Albaladejo, M.F.; Abanades, S.; Schroder, H.; Marrugat, J.; Covas, M.I., *Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/anti oxidative status in men*. *J. Nutrition*, 2004.
52. Weisburger JH, *Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases*, 2001.
53. Witztum, J.L., *The oxidation hypothesis of atherosclerosis.*, *Lancet*, 1994.
54. Βαλαβανίδης, Αναπλ. Καθηγητής-Ευσταθίου, Καθηγητής. *Η χημική ένωση του μήνα*. University of Athens Department of Chemistry, 2007.