



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ)
ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΠΡΟΒΑΤΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ
ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΗΣ ΜΕ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN TISSUES (LIVER-SPLEEN) FROM
SHEEPS CONSUMED FEED WITH OLIVE MILL WASTEWATERS**



ΣΑΒΒΑ ΣΑΛΩΜΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- 2. Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- 3. Κων/νος Πετρωτός:** Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε, ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και τα ερεθίσματα που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επιπρόσθετος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς ήταν πάντα εκεί παρών για οποιαδήποτε απορία ή βοήθεια χρειάστηκα κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων μου. ήταν τη στήριξή του.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Μακρή Σωτηρίνα, η οποία εκτελεί το διδακτορικό της πρόγραμμα, και τα δείγματα που χρησιμοποίησα για να εκτελέσω τα πειράματά μου, προήλθαν από το δικό της πρόγραμμα. Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφέρω την απέραντη στήριξη αλλά και βοήθεια που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της.

Θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω συνολικά όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή τους διδάκτορες Κωσταντίνο Γερασόπουλο, Νίκο Γκουτζουρέλα και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Υπάτιο Σπανίδη και Κούκα Παρασκευή, οι οποίοι με τις συμβουλές και την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της πτυχιακής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την

κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος γι' αυτό και τους αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Περίληψη.....	8
ABSTRACT	10
1. Εισαγωγή	12
1.1. Ιστορική Αναδρομή.....	12
1.2. Ελεύθερες Ρίζες	14
1.3. Τύποι Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου.....	16
1.3.1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΕΟ).....	17
1.4. Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)	22
1.5. Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες.....	23
1.5.1. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες	24
1.6. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών	26
1.6.1. Αντιοξειδωτική ουσία.....	27
1.6.2. Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών	27
1.6.3. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών	28
1.7. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες και οι επιπτώσεις του στην υγεία των ανθρώπων 33	
1.7.1. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων	34
1.8. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις	35
1.8.1. Πολυφαινόλες.....	36
1.9. Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου(Υ.Α.Ε.)	43
1.9.1. Ελαιοευρωπείνη	43
1.10. Επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε. .	45
1.11. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου στο περιβάλλον	47
1.12. Γενικές Πληροφορίες Για Τα Πρόβατα.....	48

1.12.1.	Χαρακτηριστικά	49
1.12.2.	Εγκυμοσύνη	49
1.12.3.	Χιώτικο πρόβατο	49
1.13.	Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών	50
1.14.	Γενικές πληροφορίες για το Ήπαρ	51
1.15.	Γενικές πληροφορίες για το Σπλήνα	53
2.	Σκοπός /Στόχος.....	55
3.	Υλικά και Μέθοδοι	56
3.1.	Γενικά	56
3.2.	Πειραματικό πλάνο.....	56
3.3	Περιγραφή σιτηρεσίου	58
3.3.1.	Παρασκευή βιολειτουργικής ζωοτροφής	58
3.3.2.	Διαδικασία Ενσιρώματος	59
3.3.3.	Προετοιμασία Ενσιρώματος ΥΑΕ	62
3.3.4.	Προετοιμασία πειραματικού σιτηρεσίου ΥΑΕ των προβάτων	64
3.4.	Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (in vitro) των ζωοτροφών.	66
3.5.	Ιστοληψία.....	67
3.5.1.	Λήψη Ιστών από ζωτικά όργανα.	67
3.5.2.	Ομογενοποίηση Ιστών	67
3.6.	Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες	68
3.6.1.	Γενικά	68
3.6.2.	Μέθοδοι	69
3.6.3.	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	85
3.6.4.	Στατιστική ανάλυση	85
4.	Αποτελέσματα.....	86
4.1.	Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τα πρόβατα.....	86

4.1.1.	Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών των προβάτων.....	91
4.2.	Αποτελέσματα Μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες σε Ηπατικό ιστό και Ιστό Σπλήνα.....	94
4.2.2.	Αποτελέσματα Καταλάσης (CAT).....	98
4.2.3.	Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	102
4.2.4.	Αποτελέσματα TBARS.....	106
4.2.5.	Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	110
5.	Συζήτηση.....	115
6.	Βιβλιογραφία	123

Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οχτώ (28) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε) και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον ηπατικό ιστό και στον ιστό της σπλήνας.

Τα είκοσι οχτώ (28) πρόβατα 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 πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων, περιέχονταν επιπλέον Υ.Α.Ε, τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Τα πρόβατα εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για πενήντα (50) ημέρες, διότι τις πρώτες 15 ημέρες, τρέφονταν μόνο με το μητρικό γάλα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ιστοληψίες – αιμοληψίες. Η πρώτη αιμοληψία – ιστοληψία πραγματοποιήθηκε δέκα πέντε (15) ημέρες μετά την γέννηση των προβάτων, από τέσσερα (4) ζώα, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία. Τα υπόλοιπα πρόβατα διαχωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες (2) ομάδες, των δώδεκα (12) 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 δεύτερη αιμοληψία – ιστοληψία πραγματοποιήθηκε σε δώδεκα (12) πρόβατα, έξι (6) από την κάθε ομάδα, ηλικίας σαράντα δύο (42) ημερών ενώ η τελευταία ιστοληψία έγινε σε δώδεκα (12) πρόβατα ηλικίας εβδομήντα (70) ημερών, έξι (6) από κάθε ομάδα.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total antioxidant Capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive Substances), για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και τέλος τα πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν:

- Για τη γλουταθειόνη (GSH) αυξημένα επίπεδά στον ιστό της σπλήνας στις 42 (110%) και 70 (149,96%) ημέρες στα πρόβατα της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου.
- Για τη καταλάσης (CAT), αυξημένα επίπεδά στον ηπατικό ιστό στις 70 (7.87%) ημέρες στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control.
- Για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), μειωμένα επίπεδά στον ηπατικό ιστό και αυξημένα επίπεδά στον ιστό της σπλήνας κατά τη σύγκριση τόσο ομάδων ελέγχου, όσο και πολυφαινολικών ομάδων.
- Για την υπεροξειδωση λιπιδίων (TBARS), μειωμένα επίπεδά στις 42 ημέρες τόσο στον ηπατικό ιστό (55,22%) όσο και στον ιστό της σπλήνας (35,22%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control.
- Για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, μειωμένα επίπεδά στις 42 ημέρες τόσο στον ηπατικό ιστό (50.07%) όσο και στον ιστό της σπλήνας (34.33%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control.

Συμπερασματικά, τα πολυφαινολικά πρόσθετα των Υ.Α.Ε είχαν ευεργετική επίδραση στον ηπατικό ιστό και στον ιστό της σπλήνας. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί η επιρροή των Υ.Α.Ε, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους στους επιμέρους ιστούς. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα ήταν θετικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια χρήση των Υ.Α.Ε στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων θα επιλύσει ταυτόχρονα και οικολογικά προβλήματα που δημιουργούνται όταν αυτά εναποτίθενται αλόγιστα στο περιβάλλον.

ABSTRACT

In the present study, a farming took place at the stage of ablactation of twenty eight (28) young sheep, the Greek "Chios" race, with feed containing polyphenolic additives from treated Olive Mill Wastewaters (OMWW) in order to examine the effects on the redox status in tissues (liver and spleen), using oxidative stress markers.

The twenty eight (28) sheep 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 Olive Mill Wastewaters. The sheep were fed with the experimental diet for fifty (50) days. Tissues were collected from the experimental animals at 3 different time-points. The first time-point was fifteen (15) days after the birth of sheep in order to check their antioxidant status at early age. The second time-points was at forty two (42) days after birth, and the last time-point was at seventy (70) days after birth.

Consequently, the antioxidant effects of the experimental feed were assessed by measuring the following oxidative stress biomarkers in tissues (liver and spleen): reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls.

According to the results:

- For the glutathione (GSH), observed elevated levels in the spleen tissue in all 42 (110%) and 70 (149.96%) days in sheep of polyphenolic group than those of the control group.
- For the catalase (CAT), observed elevated levels in liver tissue in 70 (7.87%) at day polyphenolic animals compared to control.
- For the total antioxidant capacity (TAC), observed lower levels in liver tissue and elevated levels in spleen tissue when compared to both control groups, and polyphenolic groups.
- For the lipid peroxidation (TBARS), observed reduced levels at 42 days in both liver tissue (55.22%) and in spleen tissue (35.22%) in polyphenolics animals compared to control.

- For protein carbonyls, observed decreased levels at 42 days in both liver tissue (50.07%) and in spleen tissue (34.33%) in polyphenolics animals compared to control.

Therefore, further investigations are required in order to elucidate the effects of polyphenols from OMWW, as well as their molecular mechanisms of action in the aforementioned tissues. The results from this study are encouraging, as apart from harnessing the polyphenols from OMWW to improve the animals' redox status, a concomitant reduction of the environmental pollution from the aggregation of these pollutants will be observed.

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Το οξυγόνο αποτελεί ένα πολύ κρίσιμο και βασικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής. Η ονομασία «οξυγόνο» προήλθε από τις ελληνικές λέξεις «οξύ» + «γεννώ», γιατί κατά την εποχή της ονοματοδοσίας του επικρατούσε η εσφαλμένη ιδέα ότι τα οξέα χρειάζονται οξυγόνο για να πραγματοποιήσουν τις χαρακτηριστικές τους αντιδράσεις διάβρωσης. Οι περισσότεροι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο για να επιτελέσουν την λειτουργία της κυτταρικής αναπνοής, χάρη στην οποία οι οργανισμοί παίρνουν ενέργεια διασπώντας και οξειδώνοντας τις τροφές. Παρόλο που το οξυγόνο είναι απαραίτητο για όλες τις μορφές αερόβιας ζωής, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα βλαπτικό για τους οργανισμούς. Η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου, το καθιστά τοξικό, με αποτέλεσμα να προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία. Το γεγονός ότι, από τη μία το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής αλλά από την άλλη μπορεί να γίνει και τοξικό, αποτελεί μια αντίφαση που χαρακτηρίζεται ως «βιοχημικό παράδοξο».

Το 1775 ο Priestley, ο άνθρωπος που ανακάλυψε το οξυγόνο, ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερι της ζωής πολύ γρήγορα». Αυτή η διαπίστωσή του, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».



Εικόνα 1: Priestley, ο άνθρωπος που ανακάλυψε το οξυγόνο

Τα αίτια όμως που καθιστούσαν το οξυγόνο τοξικό με δηλητηριώδεις ιδιότητες ήταν άγνωστα. Την απάντηση έδωσε το 1954ο Gershan, που σύμφωνα με τη θεωρία του η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Δύο χρόνια μετά, το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και υποστήριξε ότι αυτά τα συστατικά έχουν βασικό ρόλο στην γήρανση μέσω των πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη. Μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς αποτέλεσε η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) που έγινε το 1969. Καθώς οι έρευνες σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών συνεχίζονταν, το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αυτές αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι βλαπτικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε ευεργετικές (Marian Valko et al., 2007).

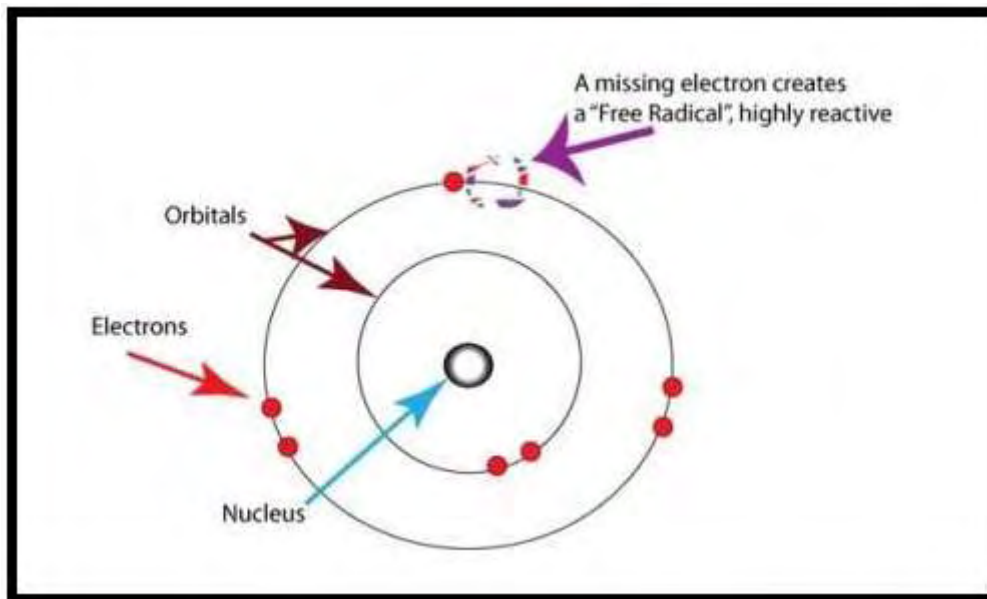
Οι ευεργετικές ιδιότητες των ελευθέρων ριζών φαίνονται από το γεγονός ότι συμμετέχουν σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού όπως για παράδειγμα στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και τη μυϊκή συστολή. Άρα συμπεραίνουμε ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο επιβλαβής για τον οργανισμό αλλά τον βοηθούν και στην ομαλή λειτουργία του (Mennen, Walker, Bennetau-Pelissero, & Scalbert, 2005). 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.

Μέρα με τη μέρα οι ερευνητές έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής

κοινότητας μεγαλώνει συνεχώς αφού πολλές μελέτες δείχνουν συσχέτιση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου με την παθογένεση πολλών ασθενειών.

1.2. Ελεύθερες Ρίζες

Είναι γνωστό ότι τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα και είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών που βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο και έτσι τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν όμως ένα ή και περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές και εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν τα άτομα ή μόρια δεν διαθέτουν τέτοια ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ονομάζονται διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να ελκύει ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτές αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (redox), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο(π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την απουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζα (free radical).

Άρα σύμφωνα με τα παραπάνω ως **Ελεύθερη ρίζα** (free radical), ορίζεται κάθε είδος ατόμου (όπως οξυγόνο ή άζωτο), μορίου ή ιόντος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, στην εξωτερική του στιβάδα, το οποίο είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge, 1990) (Gilbert, 2000).

Για παράδειγμα όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός, ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες που είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, έτσι όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ. Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του περιβάλλοντος μέσου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^\bullet$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$

(Giles & Jacob, 2002).

1.3. Τύποι Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Pani, Galeotti, & Chiarugi, 2010; Sengupta, Ghosh, & Bhattacharjee, 2004; World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 2007), το θείο (Battin & Brumaghim, 2009; Pani et al., 2010) ή τον άνθρακα.

Μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell, 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman & Slater, 1993; Gutteridge, 1995) ενώ αντίστοιχα όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν άζωτο ονομάζονται δραστικά είδη αζώτου (ΔΕΑ).

1.3.1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΕΟ)

Οι ROS χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής. Όλες έχουν μια κοινή ικανότητα, να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο, δηλαδή προκαλούν οξείδωση και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου.

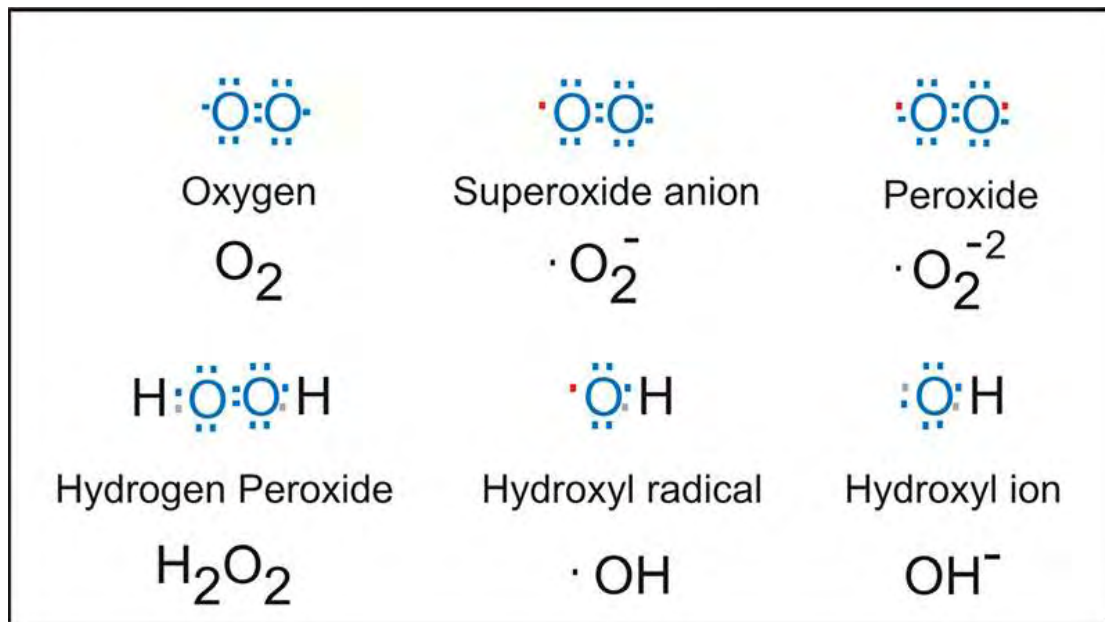
Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

(Aqil et al., 2012; Vainio, 1999; Weisburger, 2001; World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 2007)

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}),
- η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}),
- το O_2 μονής κατάστασης ή μονήρες οξυγόνο,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα.

Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό, είναι συμβολίζεται με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα.

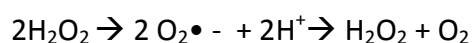


Εικόνα 3: Δραστικές μορφές οξυγόνου

1.3.1.1. Η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2\bullet^-$)

Το σουπεροξειδίο ($O_2\bullet^-$) σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e^- σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση: $O_2 + e^- \rightarrow O_2\bullet^-$

Το σουπεροξειδίο έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων». Ένζυμα που παράγουν σουπεροξειδίο είναι η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής $O_2\bullet^-$. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Το $O_2\bullet^-$, όπως και όλες οι ρίζες, έχει τη φυσική τάση να ζευγαρώσει το ασύζευκτό του ηλεκτρόνιο. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες $O_2\bullet^-$ μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH, δύο ρίζες $O_2\bullet^-$ αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



1.3.1.2. Η ρίζα υδροξυλίου (OH •)

Η ρίζα υδροξυλίου OH• είναι πολύ δραστική, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski & Cabelli, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1990)(Von Sonntag, 1987). Αυτή προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999). Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι: η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη ηλεκτρονίου και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell & Gutteridge, 1999).

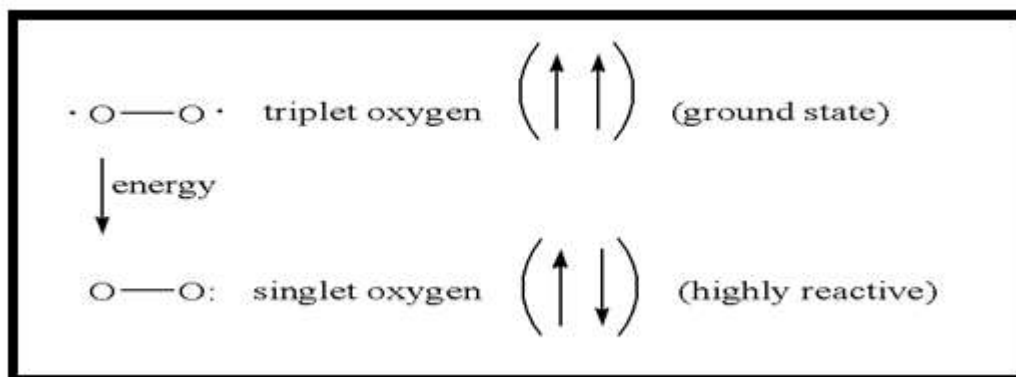
1.3.1.3. Υπεροξειδικές ρίζες (ROO-)

Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO- σχηματίζονται από την προσθήκη μοριακού οξυγόνου (O_2) σε ελεύθερες οργανικές ρίζες. Είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Παπαγεωργίου, 2005).

1.3.1.4. O_2 μονής κατάστασης ή μονήρες οξυγόνο

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το οξυγόνο μπορεί να γίνει τοξικό. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (tripletstate) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (singletstate) και συμβολίζεται με $*O_2$. Το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, όμως τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των

ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Δηλαδή, είτε μέσω απορρόφηση της επαρκούς ενέργειας για την αναστροφή του spin σε ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είτε μέσω μονοσθενής αναγωγής. Έτσι, θα προκύψει ο σχηματισμός οξυγόνου μονής κατάστασης, του οποίου τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλα spin, και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων.



Εικόνα 4: Οξυγόνο μονής και τριπλής κατάστασης.

1.3.1.5. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 παράγεται με αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια, σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

Στο μόριο του το H_2O_2 δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το H_2O_2 αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων ενδιάμεσων μορίων με οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα ($\text{HO}\cdot$), που είναι ιδιαίτερος δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του H_2O_2 στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το H_2O_2 . Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια H_2O_2 , μόλις αυτά παραχθούν (Παπαγεωργίου, 2005). Επίσης το H_2O_2 συμμετέχει στις διαβιβαστικές οδούς ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (redox sensitive genes) (Παπαγαλάνης, 2014).

1.3.1.6. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ HOCl είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H₂O₂ και το O₂⁻ και σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο που βρίσκεται στο κυτόπλασμα των φαγοκύτταρων), καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) με το χλώριο (Cl⁻), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^\bullet$

Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, εν τούτοις πολύ δραστικό χημικά. Ενοχοποιείται ότι οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, προκαλείται «οίδημα» σ' αυτά, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C, οπότε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών (Whiteman et al., 2005).

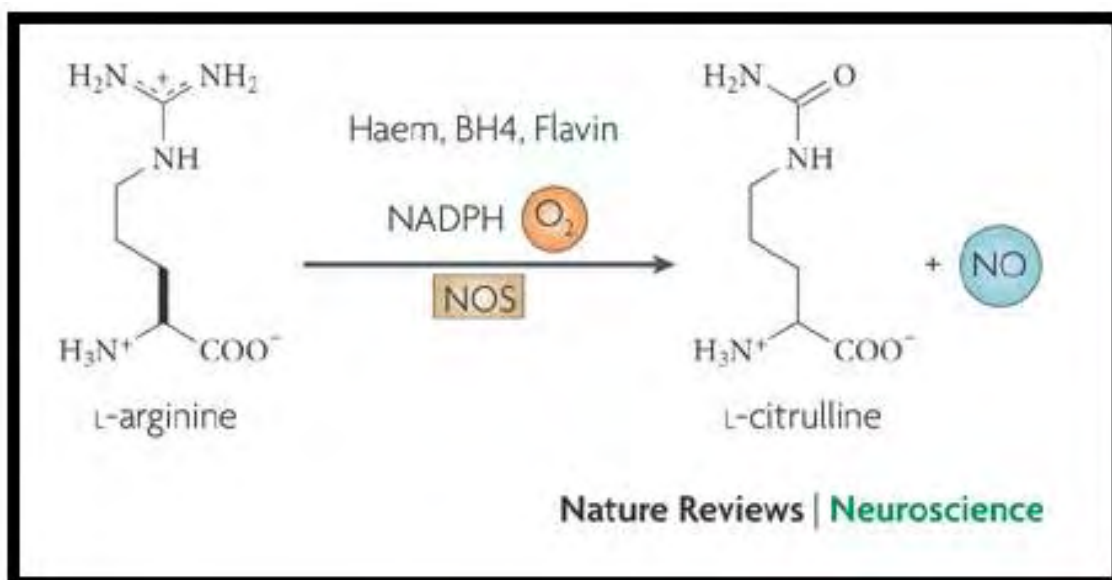
Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Παπαγαλάνης, 2014).

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, 2010).

1.4. Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

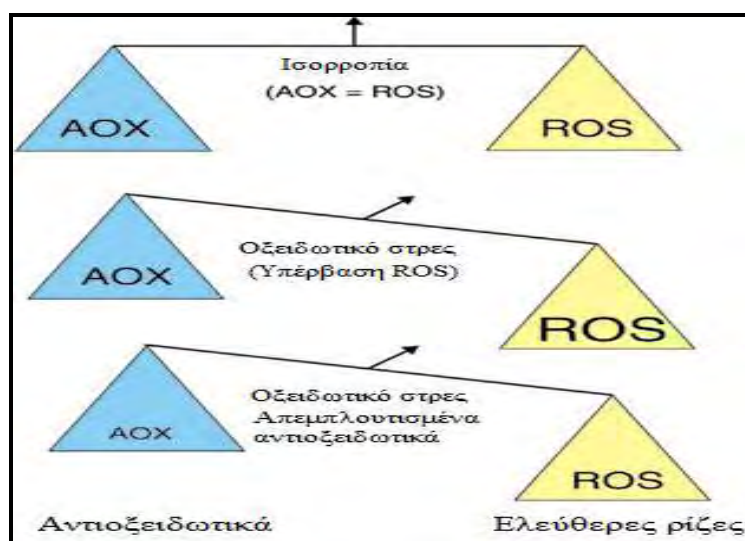
Τα δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που προέρχονται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο παράγεται μέσω της ενζυμικής δραστικότητας της συνθάσης του NO (NOS₂) (Iovine et al., 2008). Έτσι, η κύρια πηγή δραστικών ειδών αζώτου είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O₂), με το υπεροξείδιο (O₂⁻), με την αιμοσφαιρίνη και γενικά με πρωτεΐνες που περιέχουν συναθροίσεις (clusters) ομάδων με δεσμούς δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με θείο (iron- sulfur centers) καθώς και με άλλες ρίζες πρωτεϊνών και λιπών. Τα παραγόμενα προϊόντα και η τροποποίηση διαφόρων βιομορίων από αυτά, έχουν ουσιαστική συμμετοχή στο μεταβολισμό και στο επίπεδο του οξειδωτικού στρες του οργανισμού (Παπαγαλάνης, 2014).



Εικόνα 5: Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).

1.5. Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες

Γενικότερα, σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μια διαταραχή στην ισορροπία προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage). Αυτή η κατάσταση, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (Sies, 1991). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.



Εικόνα 6: Οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, όπου

έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.

Οι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες, 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.

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με νέκρωση με απόπτωση.

→μέσω της νέκρωσης, όπου το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα

→μέσω της απόπτωσης, όπου τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

1.5.1. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες επιδρούν αρνητικά σε βιομόρια όπως τα παρακάτω:

- **Λιπίδια:** Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ

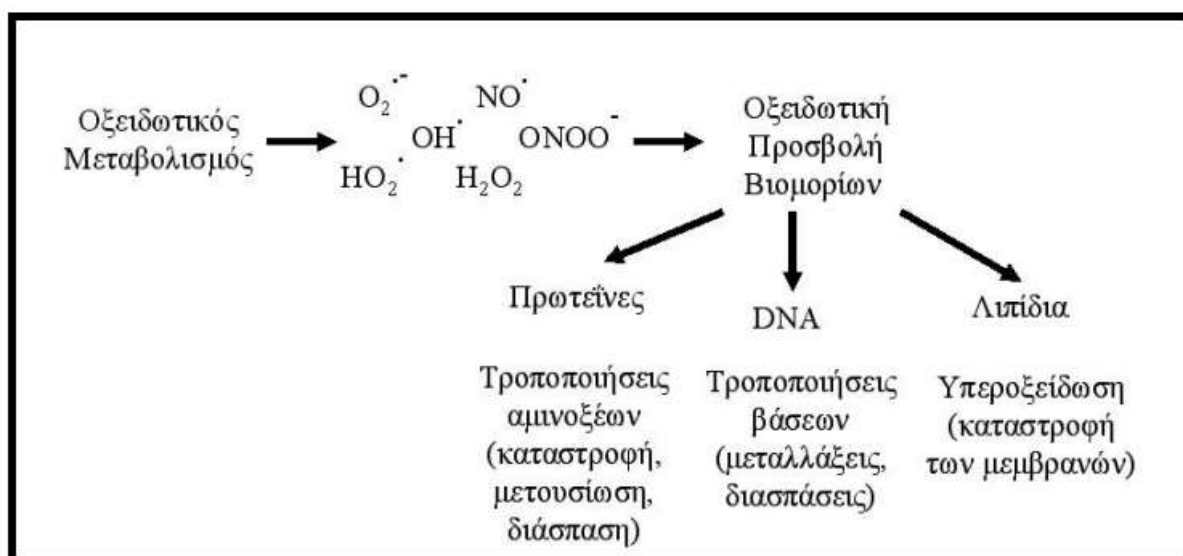
διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο.

Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO[•] κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1999).

- **Πρωτεΐνες:** Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH[•], το RO[•] και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες με άμεση και έμμεση καταστροφή από τις ROS υφίστανται αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμός και τελικά καταστροφή. Οι επιπτώσεις αυτής της καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).
- **DNA:** Παρόλο που το DNA είναι σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Για παράδειγμα η ρίζα υδροξυλίου(OH[•]) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων(Beckman&Korpenol, 1996;

Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Halliwell, 2001; Helbock, Beckman, & Ames, 1999)(Halliwell and Gutteridge, 1999).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών που συμβαίνουν και το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει τη ναρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη.



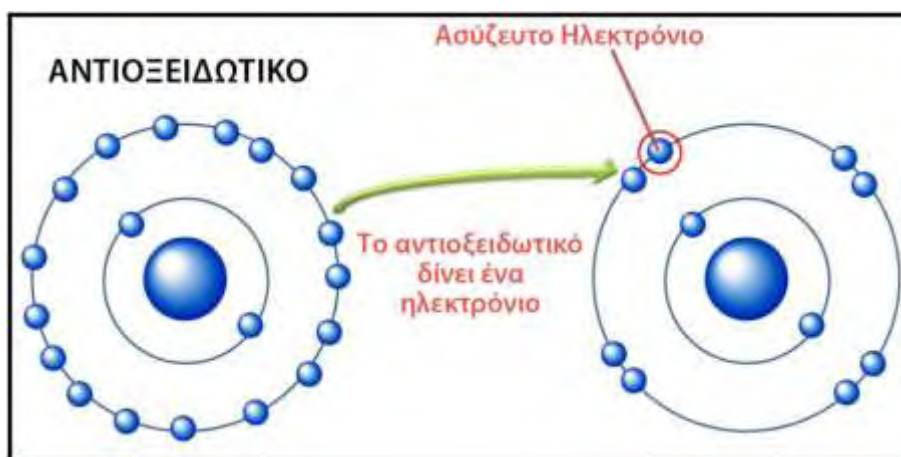
Εικόνα 7: Οι κύριες μορφές οξειδωτικής επίθεσης που δέχεται το κύτταρο.

1.6. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες είναι τοξικές για όλους τους οργανισμούς και κυρίως για τους αερόβιους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με το O₂. Έτσι, η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών τους οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, που αφορούν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, οι οργανισμοί που διαθέτουν δυνατότητα κίνησης μπορούν έμμεσα να αποφύγουν το οξειδωτικό στρες, αποφεύγοντας περιοχές υψηλής πίεσης O₂, όπως έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι μεταφοράς και τροφοδότησης των ιστών με οξυγόνο διατηρώντας όσο το δυνατόν τα επίπεδα του χαμηλά. Εκτός όμως από αυτούς, έχουν εξελιχθεί ειδικότεροι κυτταρικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας που αντισταθμίζουν άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

1.6.1. Αντιοξειδωτική ουσία

Οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων ορίζεται ως *αντιοξειδωτική ουσία* (Krinsky, 2002) (Kaplan et al., 2001).



Εικόνα 8: τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.

Για την εξάλειψη του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητη η ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό. 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.

1.6.2. Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
2. Συμβάλουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.
3. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
4. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μέταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).

5. Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

1.6.3. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- Αντιοξειδωτικά ένζυμα
- Αντιοξειδωτικά μέταλλα
- Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

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

1.6.3.1. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

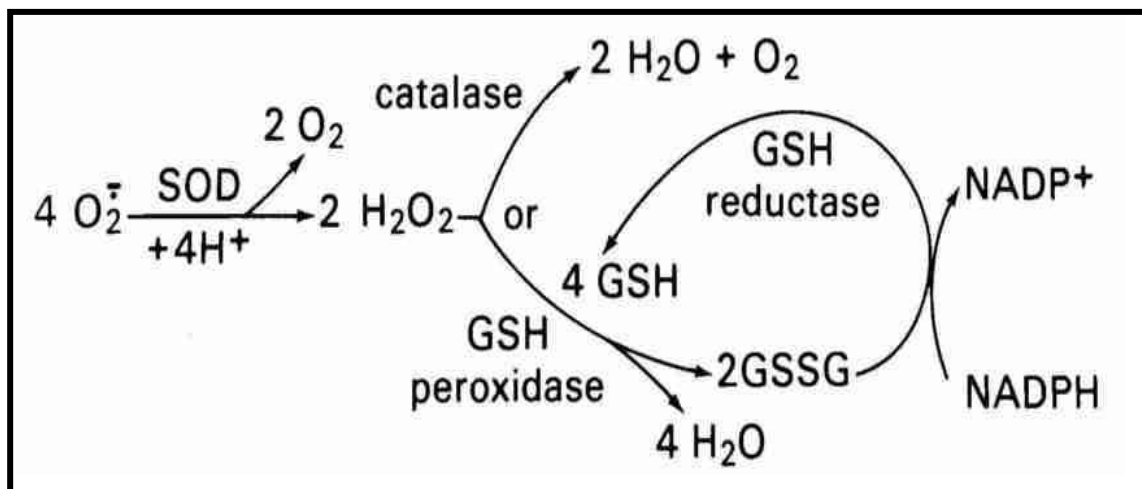
Ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.

Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες

- **υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**= μετατρέπει το $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Το $O_2^{\bullet -}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu, Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά
- **καταλάση**= μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα.
- **τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης**= είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του

- **ρεδοκτάση της γλουταθειόνης**= καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH)
- **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης**= μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία οξειδώνεται. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο (Antunes, Han, & Cadenas, 2002).

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αυτά έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (M. Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).



Εικόνα 9: τρόπος δράσεις ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

Μη Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες

Τα **μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά**, κατανέμονται ισότιμα μέσα σ'ένα ζωντανό οργανισμό.

Στο **εξωκυττάριο τμήμα**, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σ'αυτό περιλαμβάνονται η **λευκωματίνη**, η **χολερυθρίνη** και το **ουρικό οξύ**.

- **Λευκωματίνη**= ονομάζεται και **αλβουμίνη** και αναφέρεται γενικότερα σε οποιαδήποτε υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που βρίσκεται στο αίμα και παράγεται από το συκώτι. Η λευκωματίνη επιτρέπει, μεταξύ άλλων, τη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης που απαιτείται για τη διανομή των σωματικών υγρών μεταξύ των ενδοαγγειακών τμημάτων και των ιστών του σώματος.
- **χολερυθρίνη** = αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης που προέρχεται κατά 85% από την αιμοσφαιρίνη αλλά και από καταλάσες και κυττοχρώματα. Η χολερυθρίνη δημιουργείται από την δράση του ενζύμου χολοπράσινη ρεδουκτάση επί της χολοπρασίνης που αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης και είναι μια πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η χολοπράσινη ρεδουκτάση αφαιρεί το διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρρολικού δακτυλίου, στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπράσινη. Η αέναη αυτή κυκλική διαδικασία, σε συνδυασμό με τη δραστική αντιοξειδωτική λειτουργικότητα της χολερυθρίνης, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο βασικός της ρόλος είναι η αντιοξειδωτική δράση της στα κύτταρα.
- **Ουρικό οξύ**= Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να τα προστατεύει από τις ROS.

Στο **ενδοκυττάριο τμήμα**, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των

ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Markoulis, Gourgoulianis, Moulas, Gerogianni, & Molyvdas, 2006).

- **γλουταθειόνη**= είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη (Scholz RW et al, 1989). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. (Halliwell & Gutteridge, 1998). Πιο συγκεκριμένα ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες. Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ($ROOH, H_2O_2$) και τις εξωγενείς ηλεκτρόνιοφιλες (πχ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου 2005).

1.6.3.2. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα **εξωγενή αντιοξειδωτικά** είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki et al., 2003).

- **βιταμίνη E** = είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστον αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες.
- **βιταμίνη C** = με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.6.3.3. Άλλα αντιοξειδωτικά

Γενικότερα, **άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες** είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Markoulis et al., 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης.

- **Μελατονίνη** = παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού και είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματο-εγκεφαλικό φράγμα και εξουδετερώνει άμεσα τις

ελεύθερες ρίζες OH, O₂⁻ και NO. Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak, 2011).

- **Συνένζυμο Q10**= Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.7. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες και οι επιπτώσεις του στην υγεία των ανθρώπων

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, είναι πιθανόν να παρατηρηθούν σημαντικές αλλοιώσεις ή και τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, όπως προαναφέραμε. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop, 2015).

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler, Bischof, Streubel, Trost, & Richter, 2015).

Επιπρόσθετα ένα μεγάλο εύρος σημαντικών ασθενειών που φαίνεται να σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Marian Valko et al., 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνια σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, 2011).

Διάφορες κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της. Η συσχέτιση μιας νοσολογικής οντότητας με το οξειδωτικό στρες προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξειδωσης λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξειδωση αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού στρες στη νόσο. Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού στρες σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού στρες είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές οντότητες (Of, Medicine, & Harman, 2009)(Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

1.7.1. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων

Αφού η παρούσα μελέτη διεξήχθη σε ζώα και πιο συγκεκριμένα σε πρόβατα, είναι σημαντικό να αναφερθούμε ειδικά στις επιπτώσεις της υγεία των ζώων που προκαλούνται από τις διαταραχές του οξειδωτικού στρες. Αρκετές άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία, εντερίτιδα (Miller, Brzezinska-Slebodzinska, & Madsen, 1993), πυρετός (Kataria A.K. 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu & Eriksson, 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton et al., 2004), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss, Hogan, & Smith,

2004), πανώλη (Peste des petits ruminants) (PPR) (Kataria A.K. 2012α), πνευμονία (Wessely-Szponder, Bobowiec, Martelli, Wojcik, & Kosior-Korzecka, 2004) και μολύνσεις από παράσιτα προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Rouysegou, 2011), ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους (Hogan et al. 1992;(Deaton et al., 2004).

Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain & Flora, 2012) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες. Για παράδειγμα, ο απογαλακτισμός είναι μια αγχωτική περίοδος για τα γουρούνια, με αποτέλεσμα την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων (γαστρεντερικές διαταραχές) που σχετίζονται άμεσα με τους μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στο χοιρίδιο κατά την περίοδο εκείνη (Boudry, Peron, Le Huerou-Luron, Lalles, & Seve, 2004; Zhu, Zhao, Chen, & Xu, 2012).

1.8. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν και οι *βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις*. Η χημειοπροστασία ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Baliga et al., 2011; Kushi et al., 2012; Schwartz, 2014; Wang, Gao, & Fang, 2012).

Ο όρος *βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις* αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Camire, 2002)(Bidlack

et al. 2000; Meskin et al. 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Etherton et al., 2002; Marian Valko et al., 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/ φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Camire, 2002). (Bidlack et al. 2000).

1.8.1. Πολυφαινόλες

Οι **πολυφαινόλες** είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της δίαιτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau et al., 2011).

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Files, Vari, Sczzocchio, & Masella, 2010) (D'Archivio et al., 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

1.8.1.1. Χημική Δομή πολυφαινολών

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. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι

πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Papadopoulou and Frazier 2004).

1.8.1.2. Τάξεις Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Mennen et al., 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στο δακτυλίου τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτυλίους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: **φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες** (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Han, Shen, & Lou, 2007; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006). Έρευνες

έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

- **Φλαβανόλες:** Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερίκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη.
- **Φλαβόνες:** απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi and Nacz 1995).
- **Φλαβονόλες:** Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκيتينή, κατατάσσονται επίσης, η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).
- **Ισοφλαβόνες:** βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan and Clifford 2000).
- **Ισοφλαβόνες:** βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊντζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την

ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου (NO•) (Wendy L. Halli 2005).

- **Ανθοκυανιδίνες:** σε αυτές οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα ολιγομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

Μη Φλαβονοειδή

Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα **φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια.**

- **φαινολικά οξέα:** χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al., 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ.
- **λιγνάνες:** περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η

καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007).

- **στιλβένια:** έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων. Βρίσκεται και σε μικρές ποσότητες στο κόκκινο κρασί (Manach et al., 2004) γι' αυτό και σχετίζεται άμεσα με το «Γαλλικό παράδοξο».

1.8.1.3. Φυσιολογικές δράσεις των Πολυφαινολών

Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. 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 et al., 1995).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς. Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ. αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και τη

συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber, Eberl, Feucht, & Polster, 2003). Επιπλέον, αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio, Lattanzio, Cardinali, & Amendola, 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (DiCarlo, Mascolo, Izzo, & Capasso, 1999; Manach et al., 2004)(Harborne, 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (Hart & Hillis, 1974).

1.8.1.4. Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχομένες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen et al., 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Bouayed & Bohn, 2010; Rodrigo, Libuy, Feliu, & Hasson, 2014). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.

1.8.1.5. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινόλων

Πολλές έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών η οποία συμβαίνει ,μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης, μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, πολυφαινόλες δρουν:

- ως άμεσοι δευσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές).
- ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^\bullet .
- ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινόλων που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed&Bohn, 2010; Mennenetal., 2005; Tsao, 2010).

1.9. Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου(Υ.Α.Ε.)

Το ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με το πολυφαινολικό προφίλ του ελαιόλαδου και κατ' επέκταση των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου(Υ.Α.Ε), είναι ιδιαίτερα αυξημένο αφού αυτά είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχουν δείξει ότι τα πολυφαινολικά συστατικά τους παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

1.9.1. Ελαιοευρωπεΐνη

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 Vintilesco 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-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (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 & Marra, 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 δράση, κυρίως αντιοξειδωτική (Βαλαβανίδης, et al., 2007).

Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιόλαδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη Ε) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του ελαϊκού οξέος,

εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό στρες των αερόβιων οργανισμών (F Visioli, Bellomo, & Galli, 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, βαννιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες (Paradopoulos, GK., et al., 1991).

Γενικά οι ουσίες που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχουν καρδιοπροστατευτικό και νευροπροστατευτικό ρόλο και ενδοκυτταρικά ενδέχεται να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και να δημιουργούν ένα λιγότερο οξειδωτικό περιβάλλον. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλνουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, σύμφωνα με τους Paiva-Martins (Paiva-Martins et al., 2009) διαπιστώθηκε πως οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου επιδρούν στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα η 3,4-DHPEA-EDA (3-Υδροξυτυροσόλη), μία πολυφαινόλη του ελαιολάδου, μπορεί να διαδραματίσει έναν αξιοσημείωτο προστατευτικό ρόλο έναντι των ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του ανθρώπου. Χαμηλότερες δόσεις αυτής της ένωσης ήταν ικανές για την προστασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων *in vitro* και την αποτροπή της αιμόλυσης. Επίσης, αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, έχουν μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση ακόμη μεγαλύτερη από εκείνη των άλλων φαινολικών ενώσεων των τροφίμων ή των συνθετικών βιοκτόνων. (Castaner et al., 2011; Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2009; Giacosa et al., 2013; Kalogerakis, Politi, Foteinis, Chatzisyμεon, & Mantzavinou, 2013; Yamada et al., 2009)

1.10. Επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε.

Οι ωφέλιμες επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε. μπορεί να είναι στοχευμένες και μερικές από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω όπως:

1. **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, Kannel, Castelli, & Dawber, 1981). Τα δεδομένα από μια ελεγχόμενη ανθρώπινη μελέτη, 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 (Conas et al., 2006).
2. **Στην οξείδωση των λιπιδίων.** Η οξείδωση της LDL (ox-LDL) θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου (Witztum, 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 et al., 2005; Vissers, Zock, Wiseman, Meyboom, & Katan, 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 (Conas et al., 2006; Nicolaiew et al., 1998; Ramirez-Tortosa et al., 1999).
3. **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,

Evans, Dizdaroğlu, & Lunec, 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 et al., 2006).

4. **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 προ-φλεγμονώδεις παράγοντες. Η TXB2 έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του αίματος και το LTB4 έχει χημειοστατική επίδραση επί των ουδετερόφιλων, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε κατεστραμμένο ιστό (Bogani, Galli, Villa, & Visioli, 2007; Reinisch 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 πολυφαινόλων του ελαιολάδου (Francesco Visioli et al., 2005; Weinbrenner et al., 2004).
5. **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 & Vousden, 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι η φαινόλη του ελαιολάδου υδροξυτυροσόλη, αναστέλλει 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).

6. **Στη μικροβιακή δραστηριότητα.** In vitro έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις στο λάδι, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ελαιοευπρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίων πολλών στελεχών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές λοιμώξεις (Medina, de Castro, Romero, & Brenes, 2006).

1.11. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου στο περιβάλλον

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα ΥΑΕ παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της ελιάς. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης καθώς ανήκουν στην κατηγορία των επικίνδυνων αποβλήτων και για το λόγο αυτό η διαχείρισή τους έχει βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος των επιστημόνων, των τοπικών και κρατικών αρχών αλλά και των τοπικών κοινωνιών.

Μερικά από τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων που είναι τα παρακάτω:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g/l)
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l)
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των αποβλήτων των ελαιοτριβείων είναι το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο τους το οποίο δεν βιοαποδομείται εύκολα αφού αποτελείται από ενώσεις άμεσα διασπώμενες (π.χ. σάκχαρα, οργανικά οξέα,

αμινοξέα, πρωτεΐνες), από ενώσεις δύσκολα διασπώμενες (π.χ. μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, πολυφαινόλες). Επίσης τα φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά τους όπως η υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους αποδέκτες που διατίθενται. Προκαλούν την εμφάνιση βιοτοξικών και φυτοτοξικών φαινομένων και η ανεξέλεγκτη διάθεσή τους σε φυσικούς αποδέκτες προκαλεί υποβάθμιση των φυσικών συστημάτων και επιβάρυνσή τους με μεγάλες συγκεντρώσεις οργανικών και ανόργανων ενώσεων.

Επιπροσθέτως, τα απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν και πολλά ανόργανα συστατικά (ενώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, νάτριο, κάλιο, σίδηρο, κ.α.). Αν και τα ανόργανα αυτά συστατικά δεν είναι τοξικά, εν τούτοις η μεγάλη συγκέντρωσή τους και η επαναλαμβανόμενη διάθεσή τους μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στο περιβάλλον.(Arapoglouetal., n.d.; Ciceraleetal., 2009; Frankel, Bakhouché, Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, &Fernandez-Gutierrez, 2013; Tsao, 2010; Περιβάλλοντος & Σχεδιασμού, n.d.)

1.12. Γενικές Πληροφορίες Για Τα Πρόβατα

Γιατηνδιεκπεραιώσητηςπαρούσαςμελέτηςχρησιμοποιήθηκανωςπειραματικά μοντέλα πρόβατα, γι' αυτό και στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποιες πληροφορίες όσον αφορά αυτά τα ζώα.

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries* - Πρόβατον ο κριός), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (Πρόβατον - *Ovis*), είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας. Για την εξημέρωση των προβάτων υπάρχουν τεκμήρια στο Ιράκ που χρονολογούνται από το 9.000 π.Χ. Τα πρόβατα συνδέθηκαν με πολλούς πολιτισμούς, κυρίως στη Βρετανία και τη Μεσόγειο, όπου αποτελούν το πιο κοινό αντικείμενο της κτηνοτροφίας. Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι γύρω στο 40%. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο.

1.12.1. Χαρακτηριστικά

Ανάλογα με την ηλικία και το φύλο τους, ονομάζονται αρνιά μέχρι δυο μηνών, ζυγούρια μέχρι ενός έτους, κριάρια τα ώριμα αρσενικά και προβατίνες τα θηλυκά. Έχουν μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκρίζο. Ζουν 10 έως 14 χρόνια, ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσής τους. Τρέφονται με νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν σχεδόν αμάσητα, ώστε να εξασφαλιστούν κατά τη διάρκεια της ημερήσιας βοσκής οι μεγάλες ποσότητες που απαιτούνται - αργότερα όταν αναπαύονται, η τροφή επανέρχεται στο στόμα και αναμασάται.

1.12.2. Εγκυμοσύνη

Τα πρόβατα θεωρούνται πολυγαμικά ζώα. Έτσι, στο κοπάδι, σε κάθε κριάρι πρέπει να αντιστοιχούν γύρω στις 30-50 προβατίνες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί κατά μέσο όρο 150 μέρες. Ο πρώτος τοκετός γίνεται σε ηλικία 14-17 μηνών ή 2 ετών. Τα θηλυκά γεννούν 1-2 ή σπανιότερα 3-4 μικρά, ύστερα από κύηση 5 μηνών. Οι προβατίνες γεννούν μόνο μια φορά τον χρόνο, αν και βιολογικά έχουν τη δυνατότητα να γεννούν κάθε 6-7 μήνες. Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε προβατίνα αναγνωρίζει το δικό της μικρό, ανάμεσα σε πλήθος άλλων, βάσει της μυρωδιάς των μικρών της. Τα πρόβατα ενηλικιώνονται σε 2 χρόνια αν είναι αρσενικά, και σε ένα χρόνο αν είναι θηλυκά.

1.12.3. Χιώτικο πρόβατο

Το Χιώτικο πρόβατο, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, προήλθε από το ομώνυμο νησί της Χίου, στην περιοχή του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Αποτελεί διασταύρωση ομοιόμαλλου, λεπτόουρου, ελληνικού πρόβατου με παχύουρο, αναμικτόμαλλου, μικρασιάτικου πρόβατου. Τελικά, κατατάσσεται στα ομοιόμαλλα, παχύουρα πρόβατα. Λέγεται ότι παλαιότερα κτηνοτρόφοι της νήσου Χίου και της Ανατολίας, περιοχής της Μικράς Ασίας προχώρησαν σε προσμίξεις μεταξύ των ντόπιων φυλών και των φυλών Kivircik και Daglic. Το Χιώτικο πρόβατο είναι σχετικά μεγαλόσωμο με σωματικό βάρος προβατίνων 45-65 κιλά (105-155 λίβρες) και

κριαριών 65-85 κιλά (145-200 λίβρες). Θεωρείται η καλύτερη ελληνική φυλή λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής. Ο χρωματισμός του είναι λευκός με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος στο κεφάλι γύρω από τα αυτιά, τα μάτια, στην κοιλιά και στα πόδια. Τα αρσενικά διαθέτουν κέρατα με μεγάλη σπείρα ενώ τα θηλυκά, όταν έχουν κέρατα, είναι μικρά σαν ένα εξόγκωμα. Το Χιώτικο πρόβατο έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για τη γενετική βελτίωση άλλων ελληνικών και ξένων φυλών με πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής.

1.13. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών

Τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της κτηνοτροφικής και ζωικής παραγωγής αλλά και την ευζωία των ζωικών οργανισμών, η ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών φυτικής και ζωικής προέλευσης, ως πρόσθετες ύλες, για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, αφού σε αυτά αποδίδεται μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών. Ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου. Στην ηλικία απογαλακτισμού τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας, που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα ενήλικα, με αποτέλεσμα εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού να θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών που θα έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγηση λοιπόν αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Πρόσφατα, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες των υποπροϊόντων της επεξεργασίας της ελιάς (Υ.Α.Ε), λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες όπως προαναφέρθηκε.

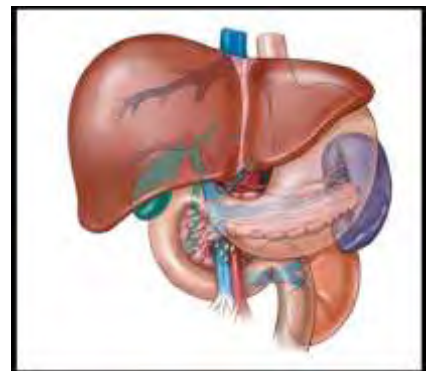
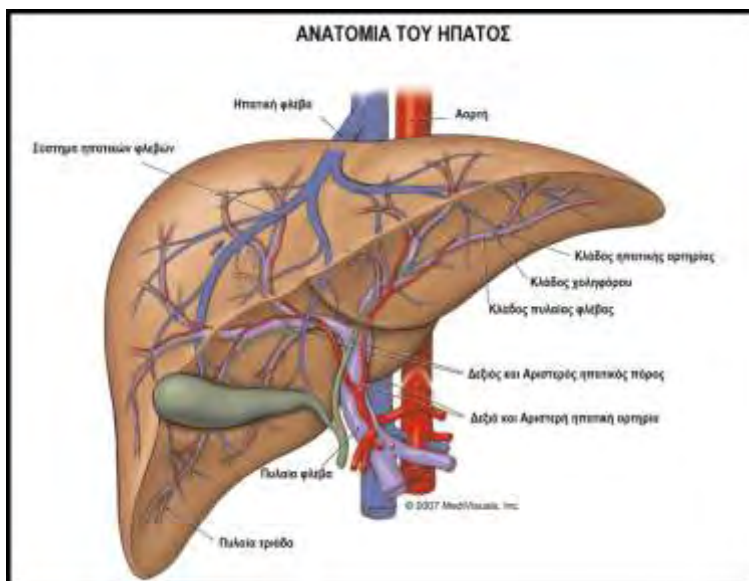
Με δεδομένο λοιπόν τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούμε να κατανοήσουμε την ιδιαίτερα σημαντική συμβολή των αντιοξειδωτικών ουσιών στην ευζωία των ζωικών οργανισμών σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους. Ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί η δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών και η εισαγωγή τους στην καθημερινή διατροφή, ειδικότερα στα πρώτα στάδια μετά την γέννησή τους όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Έτσι, οι πολυφαινόλες από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου θα χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών με σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες αλλά και τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και την αύξηση της παραγωγικότητάς τους. Τέλος δεδομένου του ότι υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου, που παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της ελιάς, είναι ρυπογόνα με την εκμετάλλευσή τους για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών μπορούμε να μειώσουμε ταυτόχρονα και τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από αυτά.

Όπως προαναφέρθηκε στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων με υγρά απόβλητα ελαιολιτριβείου στον ηπατικό ιστό και στον ιστό του σπλήνα νεαρών προβάτων. Οι ιστοί αυτοί είναι ζωτικής σημασίας για όλους τους οργανισμούς.

1.14. Γενικές πληροφορίες για το Ήπαρ

Το ήπαρ είναι ένα ζωτικό όργανο που διαθέτουν τα σπονδυλωτά, καθώς και κάποια άλλα ζώα. Βρίσκεται κάτω από το διάφραγμα, στο δεξιό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο, και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλίας, που ονομάζεται επιγάστριο. Παράγει τη χολή, ένα αλκαλικό μίγμα, που αποδομεί μικρά και περίπλοκα μόρια, πολλά από τα οποία είναι αναγκαία για της φυσιολογικές ζωτικές λειτουργίες. Το ήπαρ έχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στο οποίο περιλαμβάνεται η αποτοξίνωση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η παραγωγή βιοχημικών ουσιών απαραίτητων για την πέψη των τροφών. Είναι απαραίτητο για τη ζωή. Επί του παρόντος δεν έχει ανευρεθεί τρόπος αντιστάθμισης των λειτουργιών του, σε περίπτωση

πλήρους απουσίας του σε βάθος χρόνου, παρόλο που η αιμοκάθαρση ήπατος μπορεί να συνεισφέρει για ένα μικρό διάστημα. Το όργανο αυτό παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μεταβολισμό και επιτελεί πολλές λειτουργίες του οργανισμού, μεταξύ άλλων την αποθήκευση γλυκογόνου, καταστροφή ερυθροκυττάρων, σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος, παραγωγή ορμονών και απομάκρυνση των τοξικών ουσιών από το σώμα, είτε είναι εξωγενείς είτε είναι παράγωγα του μεταβολισμού. (Maton, et. Al. 1993).



Εικόνα 19: ανατομία του

Το ήπαρ αποτελεί μια από τις πύλες εισόδου στους ιστούς του σώματος, για το λόγο αυτό είναι εκτεθειμένο σε πιθανώς τοξικές ουσίες μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (τροφή και φάρμακα). Λόγω της θέσης, της δομής και της λειτουργίας του είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε βλάβη από τοξικές ουσίες. Μετά την απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, οι ουσίες εισέρχονται στην πύλας φλέβας και καταλήγουν στο ήπαρ. Συνεπώς, μετά το γαστρεντερικό ενδοθήλιο και το αίμα, το ήπαρ είναι το επόμενο όργανο που εκτίθεται στην ξеноβιοτική ουσία πριν αυτή εισέλθει και αραιωθεί στην συστηματική κυκλοφορία.

Το ήπαρ αποτελεί όργανο-στόχο των τοξικών ουσιών για τέσσερις βασικούς λόγους:

1. Οι μεγάλες και ποικίλες μεταβολικές δυνατότητες του ήπατος επιτρέπουν το μεταβολισμό πολλών ξеноβιοτικών ουσιών. Ο μεταβολισμός όμως δε σημαίνει πάντα τη

μετατροπή της τοξικής ουσίας σε ακίνδυνη και για το λόγο αυτό το ήπαρ συχνά αποτελεί στόχο (π.χ. παρακεταμόλη).

2. Το ήπαρ συμμετέχει στον ενδιάμεσο μεταβολισμό και συνεπώς η συμβολή του σε ενδογενείς μεταβολικές οδούς μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές βλάβες (π.χ. γαλακτοζαμίνη, αιθιονίνη).

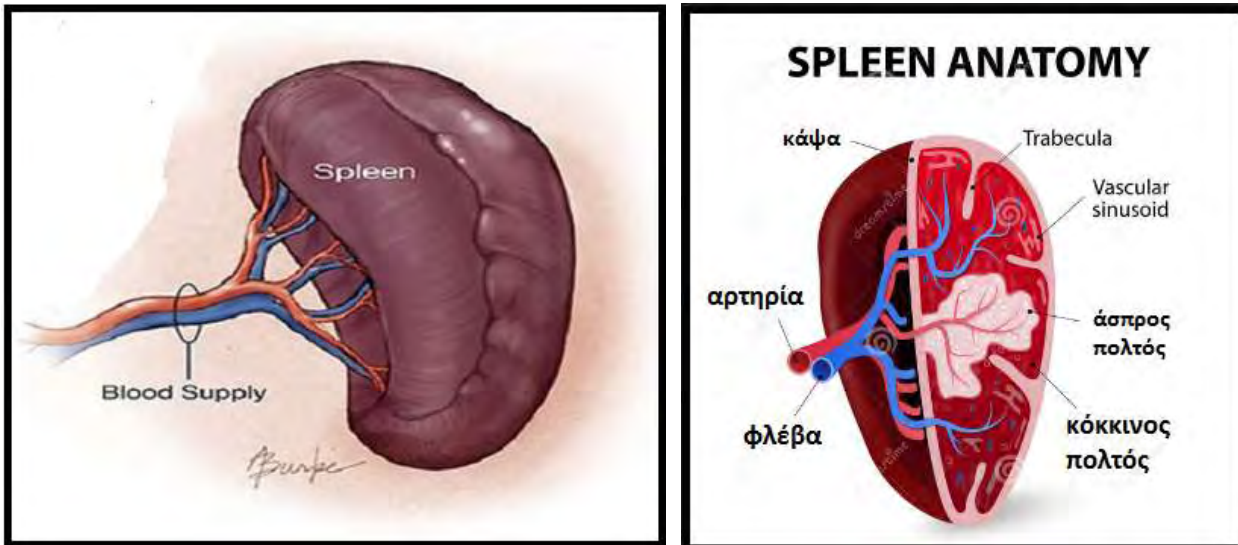
3. Η έκκριση της χολής από το ήπαρ μπορεί επίσης να είναι καθοριστικός παράγοντας. Η χολική έκκριση των ξενοβιοτικών ουσιών οδηγεί στη συμπύκνωσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. φουροσεμίδη).

4. Η παροχή αίματος εκθέτει το ήπαρ σε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών που απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα. (ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ-καθηγητής)

1.15. Γενικές πληροφορίες για το Σπλήνα

Ο σπλήνας είναι ένα λεμφοειδές όργανο των ζώων. Αποτελεί αιμοποιητικό όργανο κατά την εμβρυική ζωή καθώς συμμετέχει στην παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώ λειτουργεί και ως ηθμός που καθαρίζει το αίμα από γηρασμένα ή παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, από έγκλειστα που υπάρχουν εντός των ερυθροκυττάρων και από αντιγόνα και μικροοργανισμούς. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη μη ειδική και ειδική ανοσία του οργανισμού, συμμετέχει στο μεταβολισμό του σιδήρου και λειτουργεί ως αποθήκη λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων. Σε ορισμένα είδη ζώων, όπως στον ίππο, στο πρόβατο και στο σκύλο, η ικανότητα του σπλήνα για αποθήκευση ερυθροκυττάρων είναι σημαντικά μεγάλη. Έτσι σε περίπτωση έντονης μυικής προσπάθειας, ο σπλήνας συσπάται ελευθερώνοντας στην κυκλοφορία του αίματος μια συμπυκνωμένη μάζα ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, ο σπλήνας είναι τόπος καταστροφής των ερυθροκυττάρων και συμμετέχει στο σχηματισμό χολοχρωστικών. Ο σπλήνας, όμως, δεν είναι ένα τελείως απαραίτητο για τη ζωή όργανο. Στους ενήλικους οργανισμούς (όχι όμως και στους νεαρούς) μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στον οργανισμό καθώς οι λειτουργίες του αναλαμβάνονται από άλλους ιστούς. Στα μηρυκαστικά υπάρχουν ορισμένα γάγγλια (αιμογάγγλια) με ιστολογική δομή και ίσως και λειτουργία όμοια με εκείνη του σπλήνα. Στα γάγγλια αυτά παράγονται ερυθροκύτταρα κατά την εμβρυική ζωή

και ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα και βασεόφιλα κατά τη μετεμβρυική ζωή (Αθ.Σμοκοβίτη: Φυσιολογία, έκδοση 2007).



Εικόνα 20: ανατομία του σπλήνα

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβριους οργανισμούς. Ακολουθεί σχολιασμός των αποτελεσμάτων για κάθε ένα από αυτούς τους δείκτες.

2. Σκοπός /Στόχος

Η παρούσα διπλωματική εργασία που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στοχεύει στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα χορηγηθούν σε πρόβατα νεαρής ηλικίας, με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους άμυνας και κατά συνέπεια την βελτιστοποίηση της ευζωίας τους και την αύξηση της ζωικής παραγωγής. Από την άλλη, η επεξεργασία των ρυπογόνων υποπροϊόντων των ελαιοτριβείων, θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Γενικά

Η εκτροφή των νεαρών προβάτων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Επιστήμης και Ζωικής Παραγωγής στα Γιαννιτσά Πέλλας, με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

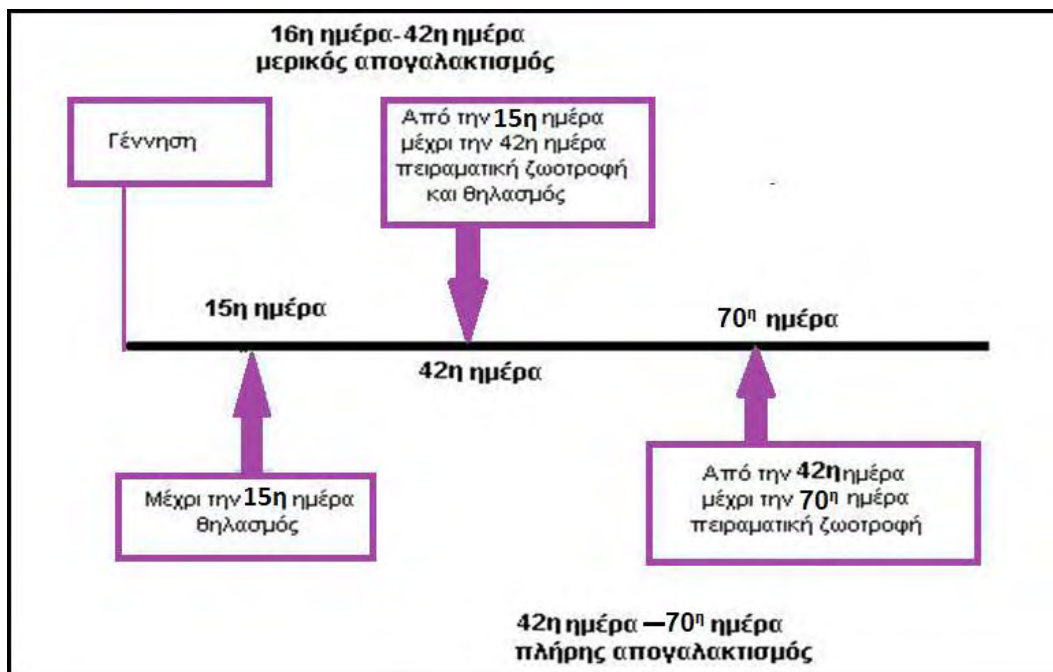
3.2. Πειραματικό πλάνο

Για την παρούσα εργασία εκτράφηκαν 28 πρόβατα. Κατά τον μήνα Δεκέμβριο γεννήθηκαν 28 αρνιά Ελληνικής φυλής «Χιώτικης» τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους, παρέμειναν με τις μητέρες του για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, με 12 πρόβατα ανά ομάδα, σε ομαδικά κελιά. Εκεί είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (τριφύλλι), για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε σύνθετο σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιολιβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά σιτηρέσια ήταν ισοενεργά, ισοπρωτεϊνικά, και ισορροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αρνιών.

Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, τα αρνιά βρίσκονταν με τις μητέρες τους. Στο διάστημα 15-42 ημερών τα αρνιά θήλαζαν και ταυτόχρονα έτρωγαν τις πειραματικές ζωοτροφές. Μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα τα πρόβατα απομακρύνονταν από τις μητέρες τους, με σκοπό να τραφούν οι μητέρες. Τις υπόλοιπες ώρες της ημέρας όπως προαναφέρθηκε τα πρόβατα θήλαζαν και τρέφονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ειδικές ταΐστρες όπου παραβρίσκονταν στο διπλανό χώρο, ο οποίος ήταν ξεχωριστός και τα πρόβατα εισέρχονταν μέσω μιας μικρής πόρτας. Παράλληλα με τις πειραματικές ζωοτροφές και τον θηλασμό τα πρόβατα τρέφονταν με μηδική (τριφύλλι). Στο διάστημα μεταξύ των 42 και 70 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο

πειραματισμός, απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα πρόβατα τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή.

Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πειραματικό πλάνο.



Εικόνα 10: Πειραματικό πλάνο εκτροφής προβάτων

Η λήψη ιστών πραγματοποιήθηκε από τα εξής ζωτικά όργανα: ήπαρ και σπλήνα, στις 15, 42 και 70 ημέρες.

3.3 Περιγραφή σιτηρεσίου

3.3.1. Παρασκευή βιολειτουργικής ζωοτροφής

Η διατροφή σήμερα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη ζωική παραγωγή καθώς δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των αγροτικών ζώων, αλλά και το κόστος παραγωγής των παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων. Γενικά, ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου.

Η ορθή επιλογή και κατάρτιση των ζωοτροφών απαιτεί την ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπιέζοντας παράλληλα το κόστος παραγωγής. Αυτό ουσιαστικά προϋποθέτει τον ακριβή καθορισμό των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά αλλά και την ακριβή γνώση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών.

Για την κατάρτιση των παρακάτω βιολειτουργικών ζωοτροφών, χρησιμοποιήθηκαν συστατικά που περιέχουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες που πληρούν τις ενεργειακές ανάγκες και εξασφαλίζουν την υγεία των προβάτων καθώς επίσης ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή τα συγκεκριμένα βιοδραστικά συστατικά, δηλαδή οι πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στο εκχύλισμα των Υ.Α.Ε έχουν μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών. Η διατροφή των προβάτων με τις συγκεκριμένες βιολειτουργικές ζωοτροφές αναμένουμε να βοηθήσει σημαντικά ειδικότερα στην ηλικία απογαλακτισμού όπου τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας και εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού.

3.3.2. Διαδικασία Ενσίρωματος

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με ψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία ψηλής 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 ζωτροφή. 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 ζωτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βακτήρια, τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια και 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)

3.3.2.1. Φάσεις Ενσίρωσης

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 ενσίρωματος. 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 επίπεδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της ενσίρωμένης 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 ενσίρωματος αυξάνεται η παραγωγικότητα των ζώων, λόγω καλύτερης διατροφής και συνδυάζεται η γεωργική με την κτηνοτροφική κατεύθυνση της επιχείρησης.

3.3.2.2. Χαρακτηριστικά ενσίρωματος

Ένα καλό ενσίρωμα ΥΑΕ 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.

3.3.3. Προετοιμασία Ενσίρωματος ΥΑΕ

Τα Υγρά Απόβλητα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενσίρωματος αραβοσίτου. Το ενσίρωμα παρασκευάστηκε πριν από τη δημιουργία των ζωοτροφών και η σύστασή του αποτελούνταν από: καλαμπόκι (αραβόσιτος), ΥΑΕ και νερό. Η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια ώστε το τελικό ενσίρωμα να έχει ποσοστό στερεών 60% και υγρασίας 40 %. Για να επιτευχθεί αυτό, πριν την ανάμειξη των υλικών, συνυπολογίστηκαν τα ποσοστά υγρασίας του αραβόσιτου και των ΥΑΕ. Κατά την παρασκευή του ενσίρωματος προστέθηκαν γαλακτικά βακτήρια που σε αναερόβιες συνθήκες προκαλούν ζύμωση.

Για την υποβοήθηση της γαλακτικής ζύμωσης, χρησιμοποιήθηκε στάνταρ εμπορικό σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων που διαλυόταν σε νερό και μετά από μία διαδικασία αναγέννησης γινόταν η 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 1/10w/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, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν με θερμοσυγκόλληση αεροστεγώς με χρήση ειδικού μηχανήματος. Μετά την σφράγιση των σακουλών που περιείχαν το προς ενσίρωση υλικό, το 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 σακουλιών και η δημιουργία αερόβιων συνθηκών που δεν ευνοούν την γαλακτική ζύμωση, κάθε δύο με τρεις ημέρες το υλικό υφίστατο εκ νέου συσκευασία σε πλαστικές νέες πλαστικές σακούλες κατά τον ίδιο τρόπο και πάλι υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphenolic), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραιώση του ενσιρώματος με απεσταγμένο νερό.



Εικόνα 11: Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσκευή Αποσυμπίεσης

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

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

3.3.4. Προετοιμασία πειραματικού σιτηρέσιου ΥΑΕ των προβάτων

Για τις ανάγκες του πειράματος, παρασκευάστηκαν δυο διαφορετικά σιτηρέσια. Κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση στην ομάδα Α-ομάδα ελέγχου-control) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (χορήγηση στην ομάδα Β-πολυφαινολική). Τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισορροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προβάτων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα πρόβατα της ομάδας Α και Β, μέχρι τον απογαλακτισμό

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Α ΜΑΡΤΥΡΑ		ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Β ΥΑΕ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΥΑΕ	45
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	9
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΓΑΛΑ	20	ΓΑΛΑ	20
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8

Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα πρόβατα της ομάδας Α και Β, μετά τον απογαλακτισμό

ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Α ΜΑΡΤΥΡΑ		ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟΥ ΟΜΑΔΑΣ Β ΥΑΕ	
ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%	ΖΩΟΤΡΟΦΗ	%
ΚΑΡΠΟΣ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ	45	ΕΝΣΙΡΩΜΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ & ΥΑΕ	45
ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13	ΚΑΡΠΟΣ ΣΙΤΟΥ	13
ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15	ΠΙΤΥΡΑ ΣΙΤΟΥ	15
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18	ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	18
ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4	ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ	4
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5	ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	2,5
ΑΛΑΣ	0,5	ΑΛΑΣ	0,5
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2	ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,2
ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8	ΦΩΣΦ. ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ	0,8

Συγκεκριμένα, για το ενσίρωμα ΥΑΕ (ελαιοτριβείου) χρησιμοποιήσαμε:

- 80 κιλά καλαμπόκι αλεσμένο
- 20 λίτρα ΥΑΕ(με 4% στερεά)
- 20 λίτρα Η₂O

και σύμφωνα με αυτές τις αναλογίες, στην τελική ζωοτροφή, το καλαμπόκι της ομάδας ελέγχου περιείχε 60% στερεά και 40% υγρασία, ενώ το καλαμπόκι της πολυφαινολικής ομάδας αποτελούνταν από 52,5 στερεά, 7,5% ΥΑΕ και 40% υγρασία.

3.4. Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης (in vitro) των ζωοτροφών.

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης και των δύο πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις εξής μεθόδους:

I. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του **DPPH**

Η μέθοδος του DPPH βασίζεται στη χρήση της ρίζας του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία μιας αντιοξειδωτικής ένωσης που λειτουργεί ως δότης ιόντων υδρογόνου, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (Apostolou et al., 2013).

II. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του **ABTS**

Η μέθοδος του ABTS βασίζεται στη χρήση του ενζύμου horseradish peroxidase κατά την οποία η ένωση του ABTS μετατρέπεται στη ρίζα ABTS+•. Η προσθήκη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας στο διάλυμα της ρίζας ABTS+• έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή της ρίζας με τη μεταφορά ιόντων υδρογόνου. Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 730 nm (Apostolou et al., 2013).

Μέσω των παραπάνω μεθόδων προσδιορίζεται η τιμή IC50, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών η οποία εξουδετερώνει την ρίζα (DPPH, ABTS) κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC50 τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας. Έτσι υπολογίζοντας το IC50 των ζωοτροφών μπορούμε να εκτιμήσουμε την δραστηριότητα και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

3.5. Ιστοληψία

3.5.1. Λήψη Ιστών από ζωτικά όργανα.

Οι σφαγές πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο του Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Οι σφαγές πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη ηλικία των ζώων με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας στην πρόωρη ηλικία, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία, δηλαδή κατά τον απογαλακτισμό και τέλος, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (βάρος σφάγιου).

Οι ιστοί των ζωτικών οργάνων του σπλήνα και του ήπατος αφαιρέθηκαν χειρουργικά με τη βοήθεια νυστεριού, μεταφέρθηκαν σε ειδικές κασέτες, σε υγρό άζωτο και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους.



Εικόνα 12: Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

3.5.2. Ομογενοποίηση Ιστών

Η ομογενοποίηση τόσο του ηπατικού ιστού, όσο και του ιστού του σπλήνα μπορεί να γίνει με 2 τρόπους με γουδί και γουδοχέρι ή με ομογενοποιητή. Στην παρούσα εργασία εκτελέστηκε με ομογενοποιητή: Μέσα σε falcon προσθέσαμε περίπου 0,5-

0,6g ιστού και PBS σε αναλογία 1:2 και πραγματοποιήσαμε ομογενοποίηση με τον ειδικό ομογενοποιητή. Ακολούθως, προσθέσαμε το μείγμα σ' ένα Eppendorf και το ομογενοποιήσαμε περαιτέρω με υπερήχους. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση (15.000g, 5min, 4oC), πήραμε το υπερκείμενο και το προσθέσαμε σε νέα Eppendorf. Τέλος, αφότου ομογενοποιήθηκαν όλοι οι ιστοί, διατηρήθηκαν στους -80oC μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 13: Τα Εργαλεία που Χρησιμοποιήθηκαν για την Ομογενοποίηση Ιστών.

3.6. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες

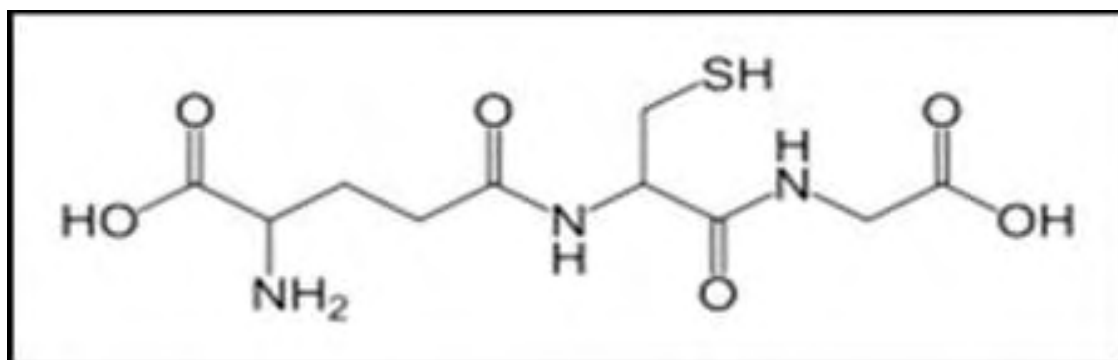
3.6.1. Γενικά

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

3.6.2. Μέθοδοι

3.6.2.1. 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, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

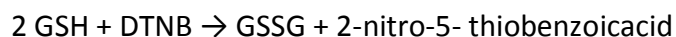


Εικόνα 14: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

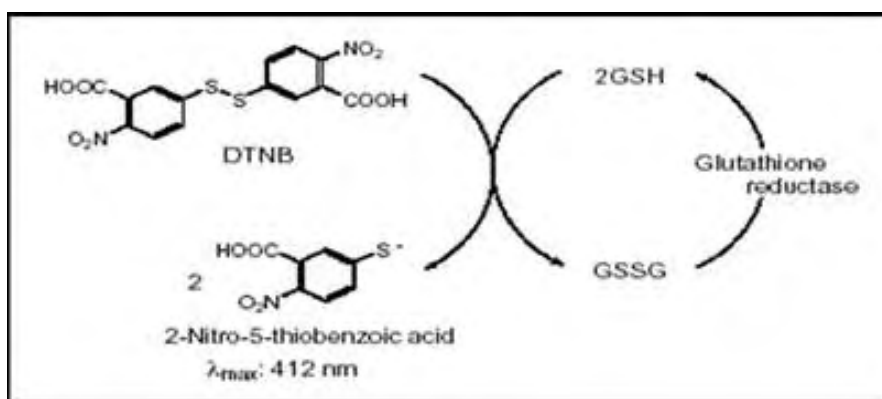
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin & Brumaghim, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων 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 et al., 2004).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδιο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετريέται 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 14: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 67 mM (pH 7,95).** MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ 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

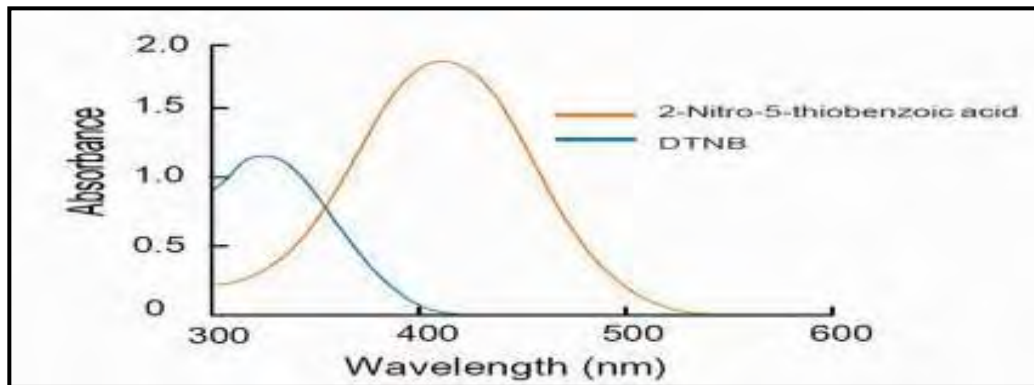
- **Κιτρικό Νάτριο.** ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

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:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	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 (BEERS & SIZER, 1952).



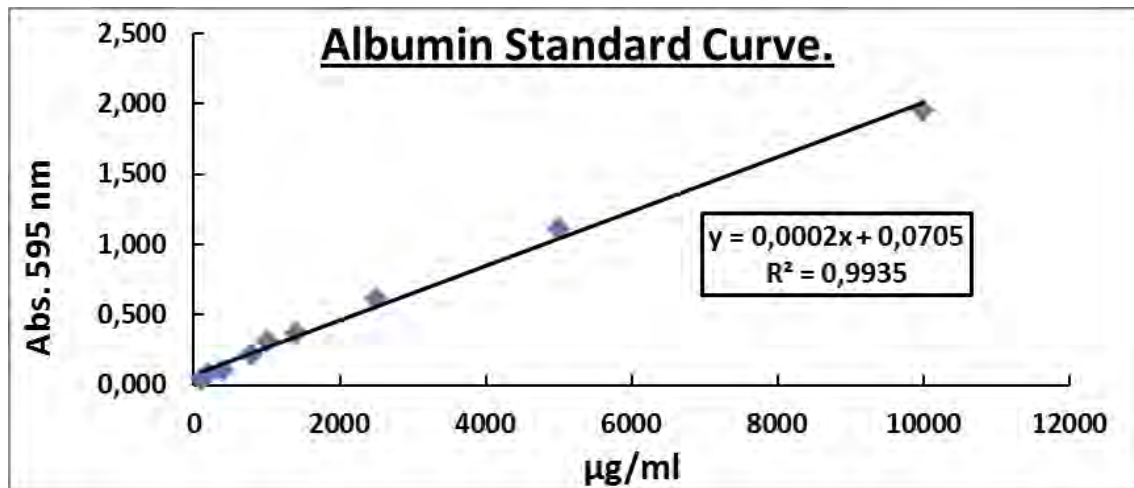
Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θεοβενζοϊκού οξέος (DojindoMolecularTechnologies).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total prot.) = $(\text{Abs}$ δείγματος - $\Delta\text{abstυφλού}/13.6) \times 2 \times 3$ (λόγω αραιώσεων) $\times 50.5$ / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του ιστού (20 μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ηπατικό και τον ιστό σπλήνα 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 nm και ο $x = \text{Συγκέντρωση } (\mu\text{g}/\text{ml})$. Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

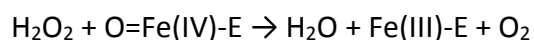
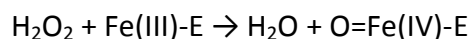
3.6.2.2. Δραστικότητα της Καταλάσης.

Αρχή της μεθόδου.

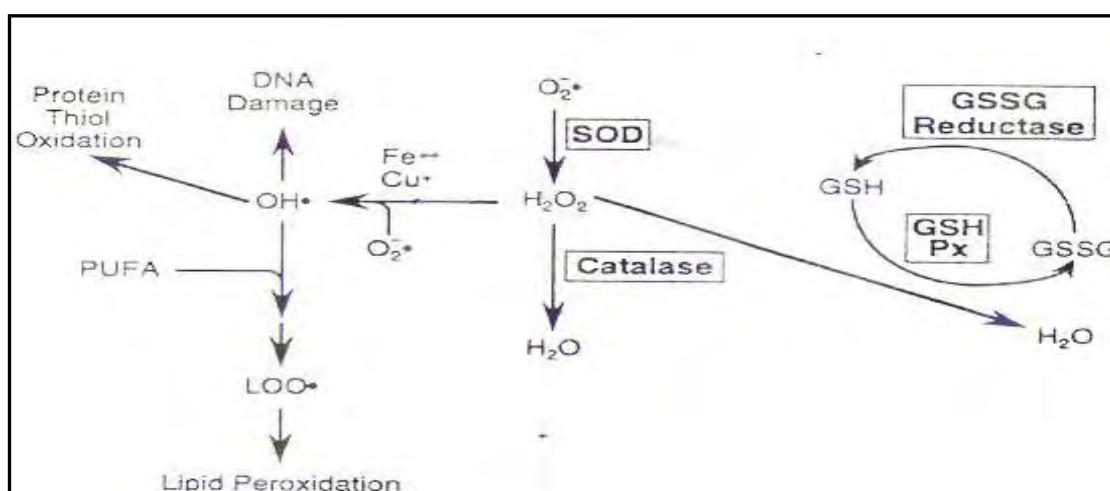
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική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

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

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

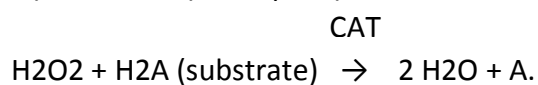


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 16: Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O .

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



Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi (Aebi, 1984).

Διαλύματα

- **Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα

διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).**

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	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% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας πάραφιλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (ΔAbs sample per min / 40) x (75 x 1000 x 3 x 2) / Conc. Protein (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3για τον ηπατικό ιστό και τον ιστό της σπλήνας για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

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

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$. ΔAbs blank είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού (One Unit decomposes one micromole of hydrogenperoxide per minute at 25 °C pH 7.0).

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

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, 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 Janaszewska και Bartosz (Janaszewska & Bartosz, 2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Διαλύματα

• **Phosphatebuffer 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:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μ L	495 μ L	460 μ L
DPPH 0.1 mM	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μ L	-
Ιστός (Αραίωση 1/5)	-	-	40 μ L

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

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

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

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

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3για τον ηπατικό ιστό και τον ιστό της σπλήνας για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/5 κατά τη μέτρηση.

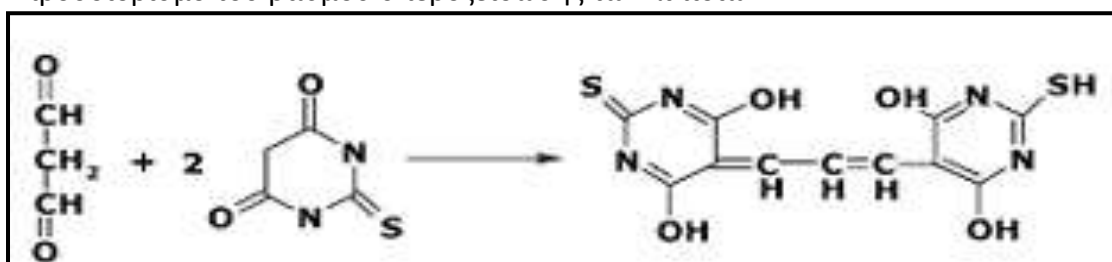
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

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

Αρχή της μεθόδου.

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



Εικόνα 17: 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, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Διαλύματα

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

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (tris-hydroxymethylaminomethane). 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 φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επιάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επιάζουμε 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 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ηπατικό ιστό και τον ιστό της σπλήνας, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 ξανά επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

3.6.2.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

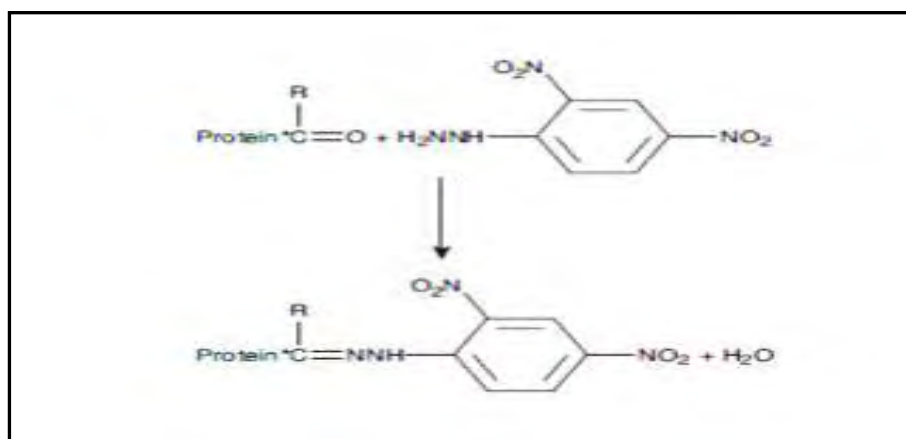
Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου C = O, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές

ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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

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 DNPH (2,4-δινιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο (Patsoukis et al., 2004).



Εικόνα 18: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δινιτριφαινυλαδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

Διαλύματα

• **Διάλυμα HCl 2.5 N. HCl:** MB 36.46; stock 37% (10.1 N): Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

• **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1): Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

• **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06): Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

Επιάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 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 επιάζουμε 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 15000 g για 3 λεπτά στους 4°C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

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

Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= $\frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{0.022 \times 1000 / 50} \times 2 \text{ ή } 3 \times 2 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον ηπατικό ιστό και τον ιστό της σπλήνας, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά).

3.6.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford M.M 1976).

3.6.4. Στατιστική ανάλυση

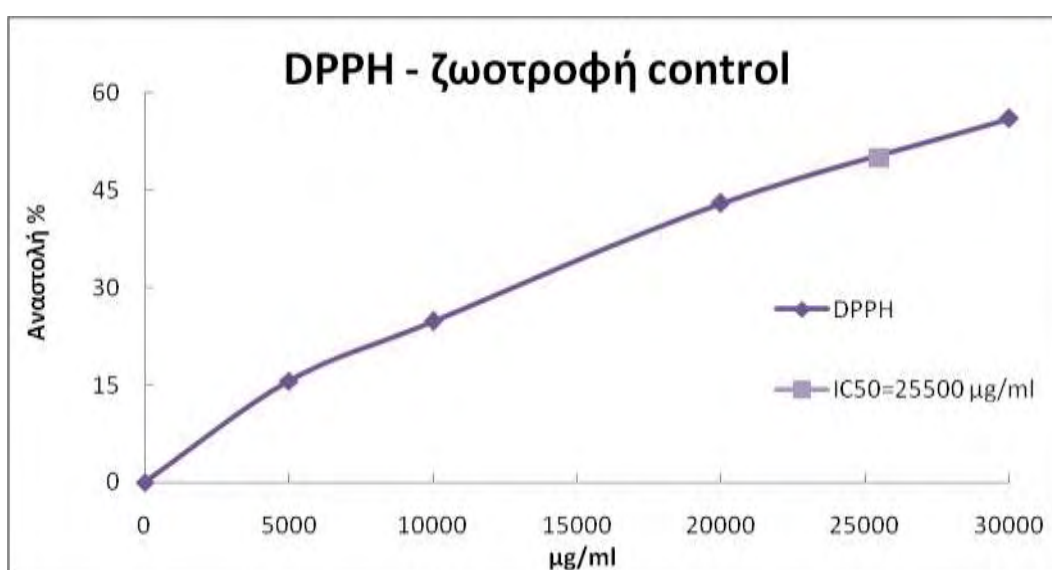
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, ως μέση τιμή \pm SEM ενώ στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS 22. Συγκεκριμένα, εκτελέσθηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε $*p < 0.05$.

4. Αποτελέσματα

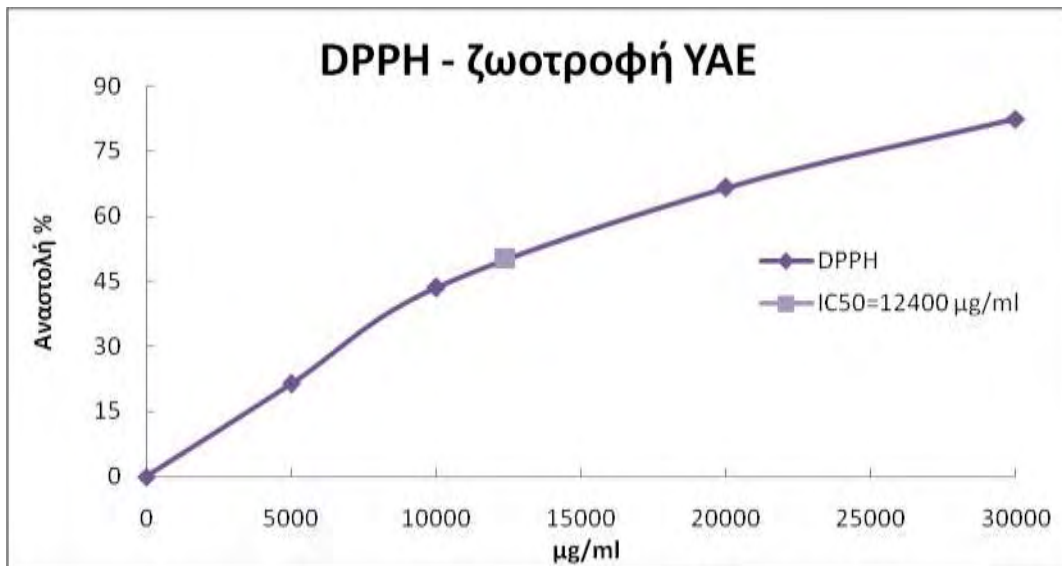
4.1. Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τα πρόβατα

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα στα οποία απεικονίζονται η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH, ABTS σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των ζωοτροφών.

Διαγράμματα της ρίζας DPPH



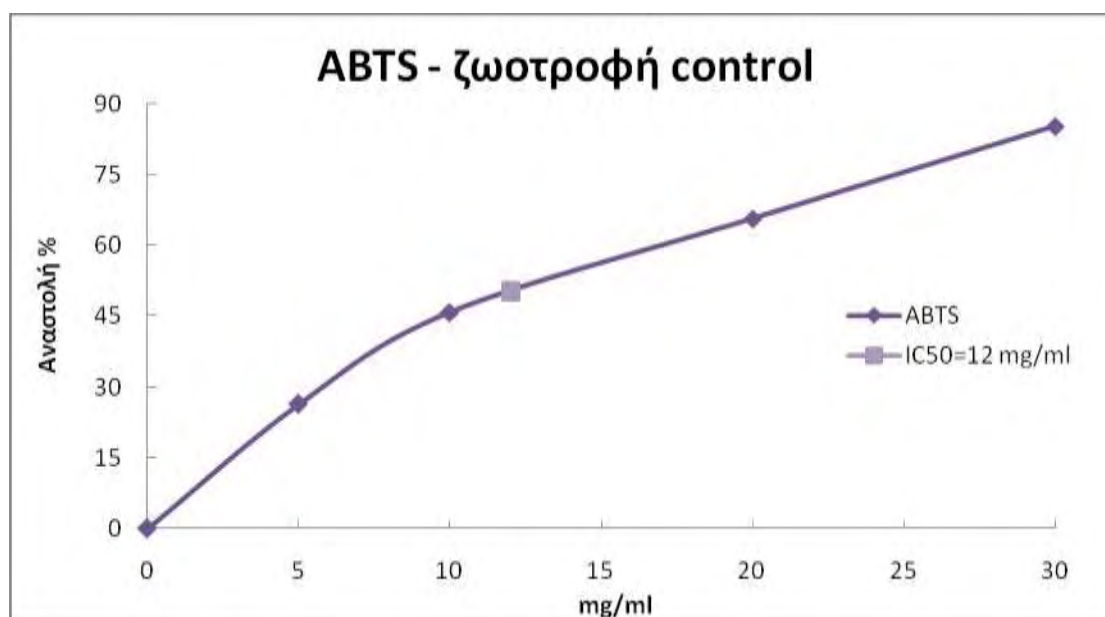
Διάγραμμα 2: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



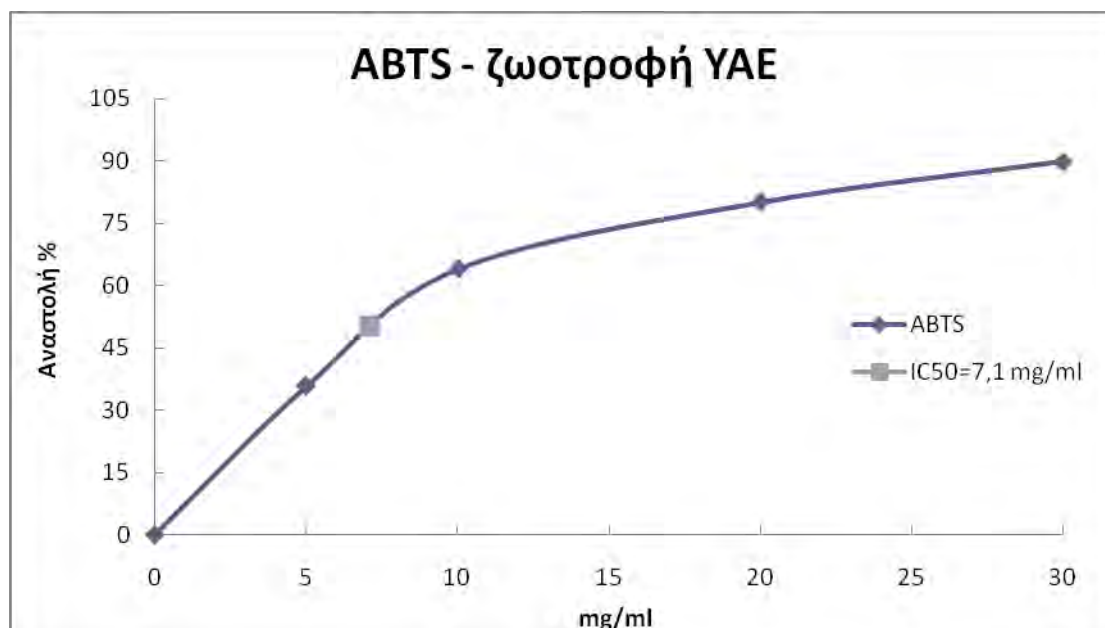
Διάγραμμα 3: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με ΥΑΕ.

Από τις παραπάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρείται ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα ελαιотριβείου (ΥΑΕ), παρουσιάζει τιμή $IC_{50} = 12,4 \text{ mg/ml}$, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου παρουσιάζει τιμή $IC_{50} = 25,5 \text{ mg/ml}$. Κατά συνέπεια, η ζωοτροφή με τα υγρά απόβλητα ελαιотριβείου (ΥΑΕ), παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα (σχεδόν διπλάσια) σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

Διαγράμματα της ρίζας του ABTS



Διάγραμμα 4: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



Διάγραμμα 5: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με ΥΑΕ.

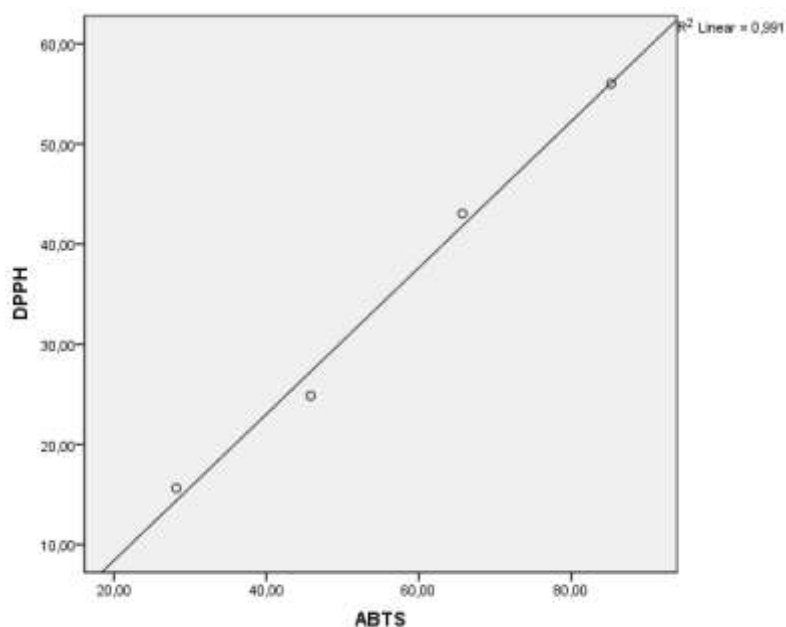
Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS οι τιμές IC₅₀ που παρατηρούνται στη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντων ελαιολιτριβείου (ΥΑΕ) είναι IC₅₀ = 7,1 mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου είναι IC₅₀ = 12

mg/ml. Γενικά παρατηρούμε ότι οι τιμές IC50 είναι πιο χαμηλές σε σύγκριση με αυτές της ρίζας του DPPH, το οποίο οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Και σε αυτή, όμως, την περίπτωση η δραστηριότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) είναι σχεδόν διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

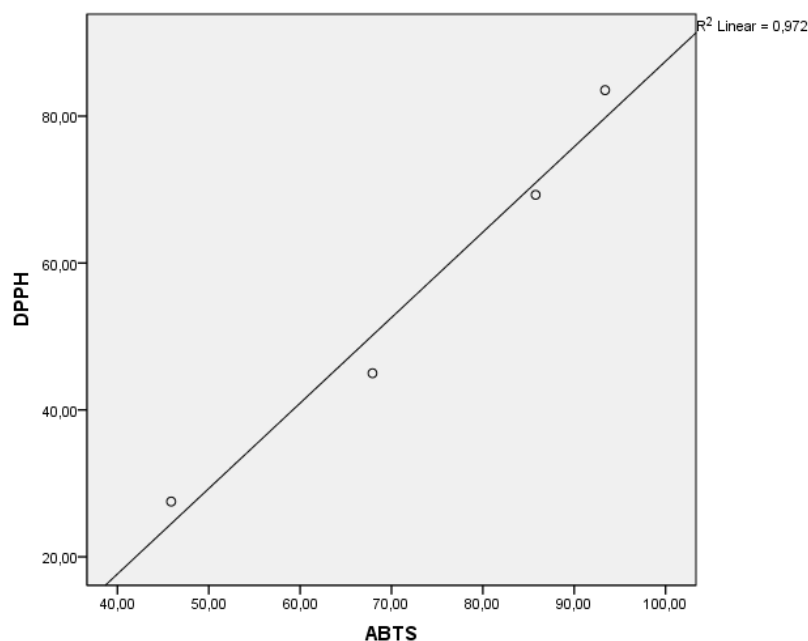
Για την συσχέτιση των δύο ζωοτροφών και τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες DPPH και ABTS, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

Διάγραμμα Ζωοτροφής ομάδας ελέγχου (control)



Διάγραμμα 7: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,991$, $p < 0,05$).

Διάγραμμα Ζωοτροφής εμπλουτισμένης με ΥΑΕ



Διάγραμμα 8: Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,972$, $p < 0,05$).

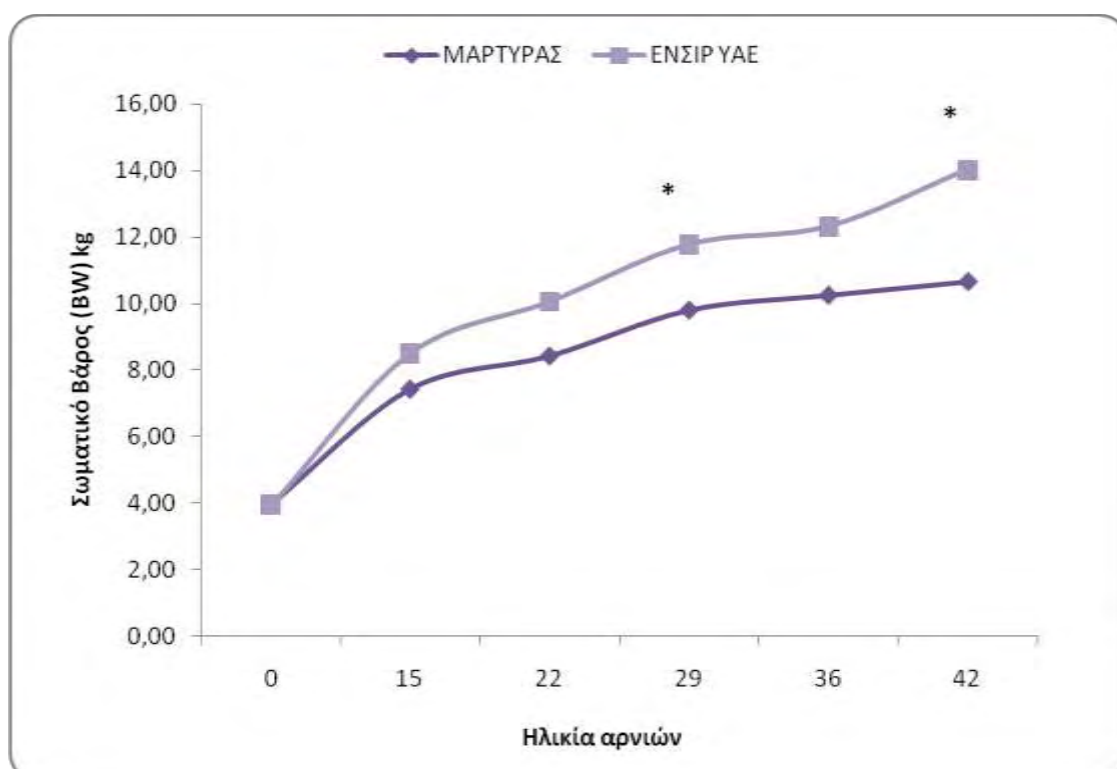
Υπολογίζοντας τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, ανάμεσα στις τιμές IC50 που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους (DPPH, ABTS), τόσο στην ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου ($r=0,99$) όσο και στην ζωοτροφή εμπλουτισμένη με το ενσίρωμα Υ.Α.Ε ($r=0,97$), παρατηρείται μια μεγάλη συσχέτιση που σημαίνει ότι τα ίδια πιθανώς βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες.

Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών

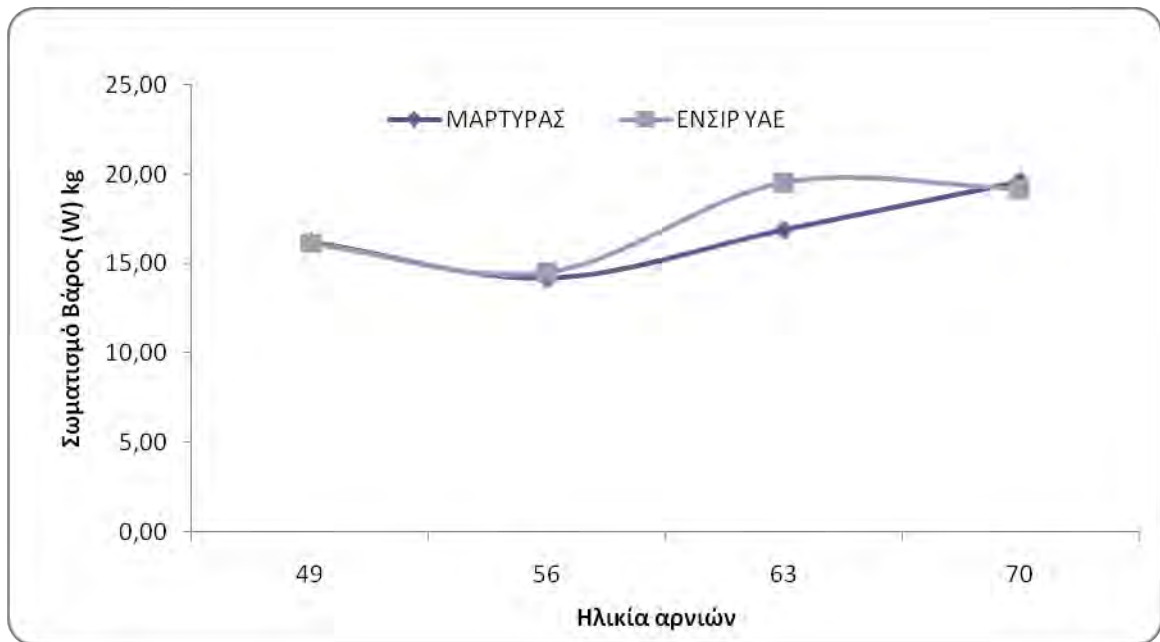
Ζωοτροφές	DPPH(IC50) mg/ml	ABTS(IC50) mg/ml
Ελέγχου (πρόβατα)	25,5	12
Υ.Α.Ε (πρόβατα)	12,4	7,1

Εάν παρατηρήσουμε τα συνολικών αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι τα βιοδραστικά συστατικά των Υ.Α.Ε(που είναι κυρίως πολυφαινόλες) προσδίδουν στις ζωοτροφές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα κάτι το οποίο αναμένουμε να παρατηρήσουμε και στους δείκτες ευζωίας των προβάτων.

4.1.1. Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών των προβάτων.

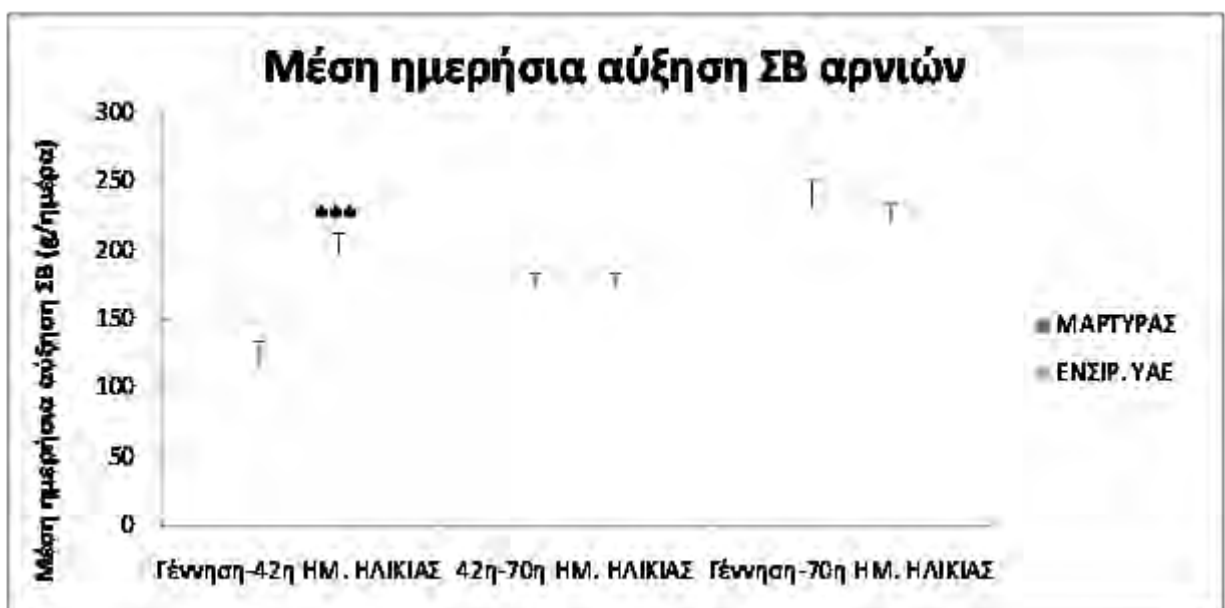


Διάγραμμα 9α: Εξέλιξη σωματικού βάρους των αρνιών μεταξύ των ομάδων control και Υ.Α.Ε 42 ημέρες από τη γέννησή τους.



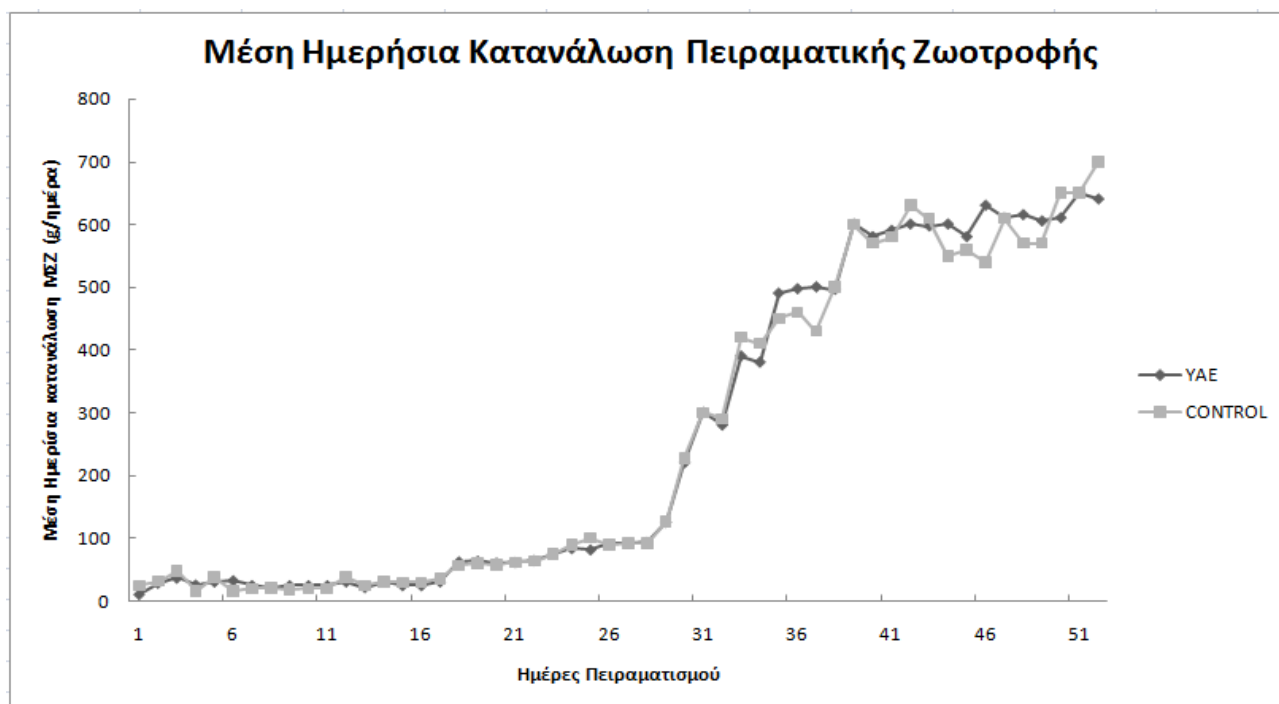
Διάγραμμα 9β: Εξέλιξη σωματικού βάρους των αρνιών μεταξύ των ομάδων control και Υ.Α.Ε, κατά την περίοδο πλήρους απογαλακτισμού (42-70 ημέρες).

Παρατήρηση: Παρατηρούμε μια αύξηση του σωματικού βάρους των αρνιών των ομάδων που κατανάλωσαν τροφή με Υ.Α.Ε σε σχέση με την ομάδα control μέχρι και τις 42 ημέρες από τη γέννησή τους. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται στις 29 και 42 ημέρες μετά τη γέννηση. Αντίθετα, από το διάστημα των 42 έως 70 ημερών παρατηρούμε μια σταθερότητα στο βάρος των αρνιών μεταξύ των ομάδων control και Υ.Α.Ε.



Διάγραμμα 10: Ημερήσια μεταβολή σωματικού βάρους αρνιών.

Παρατήρηση: Παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην ημερήσια μεταβολή του σωματικού βάρους των αρνιών που κατανάλωσαν τροφή εμπλουτισμένη με Υ.Α.Ε σε σχέση με την ομάδα control από τη γέννηση μέχρι και τις 42 ημέρες, ενώ από το διάστημα των 42 μέχρι 70 ημερών και το διάστημα από τη γέννησή τους μέχρι και τις 70 ημέρες δεν παρατηρούμε καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων control και Υ.Α.Ε.



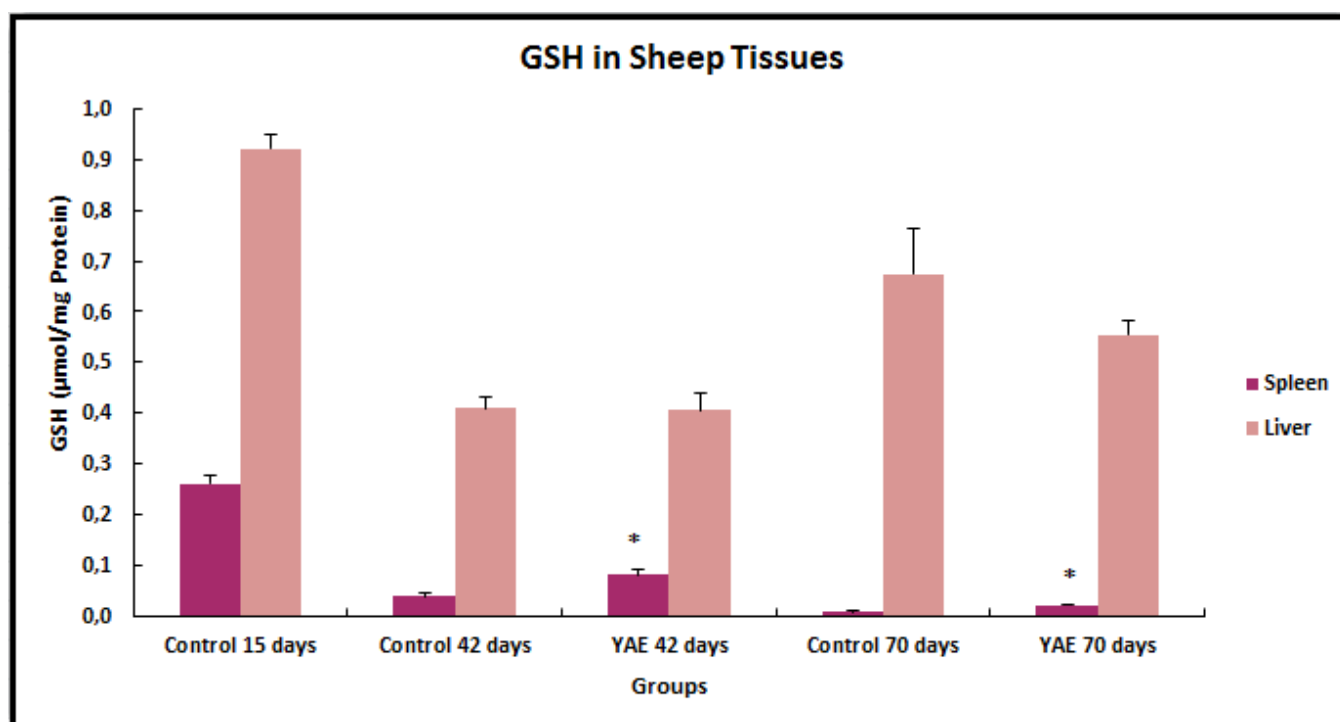
Διάγραμμα 11: Μέση ημερήσια κατανάλωση ζωοτροφής σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού (διάστημα 15-70 ημερών).

Παρατήρηση: Δεν παρατηρούμε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στην Μέση Ημερήσια Κατανάλωση της κανονική ζωοτροφής σε σχέση με την ζωοτροφή εμπλουτισμένη με Υ.Α.Ε σε καμία από τις δύο φάσεις του πειραματισμού.

4.2. Αποτελέσματα Μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες σε Ηπατικό ιστό και Ιστό Σπλήνα

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους δύο ιστούς των προβάτων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, (ηπατικός ιστός και ιστός σπλήνα) φαίνονται στα παρακάτω συγκεντρωτικά διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται τόσο στις ομάδες control και στις πολυφαινολικές ομάδες (ΥΑΕ) όσο και ξεχωριστά για την παρατήρηση των μεταβολών στα αναπτυξιακά τους στάδια, όσο και μεταξύ τους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας της βιολειτουργικής ζωοτροφής.

4.2.1. Αποτελέσματα Γλουταθειόνης (GSH)



Διάγραμμα 12: Τα επίπεδα δραστηριότητας της GSH (μmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό και στον ιστό της σπλήνας, διαφορετικών ομάδων ηλικίας προβάτων κρεατοπαραγωγής. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Παρατηρήσεις:

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα της GSH, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0.001$) και στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0,035$). Αντίθετα από τις 15 στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πίνακας 1: Τα επίπεδα δραστηριότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control στον ηπατικό ιστό στις 15, 42 και 70 ημέρες.

GSH($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,921 \pm 0,031	0,409 \pm 0,022	0,674 \pm 0,089

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της GSH παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0.000$), μια στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.010$). Ομοίως παρατηρείται και μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.000$).

Πίνακας 2: Τα επίπεδα δραστηριότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15 ημέρες και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

GSH($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,921 \pm 0,031	0,406 \pm 0,034	0,555 \pm 0,027

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της GSH από τα control στα πολυφαινολικά ζώα. ($p=0.948$)

Πίνακας 3: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. \pm SEM	0.409 \pm 0.022	0.406 \pm 0.034

Στις 70 ημέρες παρατηρούμε ότι και πάλι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της GSH από τα control στα πολυφαινολικά ζώα. ($p=0,292$)

Πίνακας 4: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0.674 \pm 0.089	0.555 \pm 0.027

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα της GSH, παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0,000$), από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0,040$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0,000$).

Πίνακας 5: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15,42 και 70 ημέρες.

GSH($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,261 \pm 0,018	0,039 \pm 0,005	0,008 \pm 0,002

Ιστός Σπλήνα→Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε όπως και προηγουμένως μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0,000$), από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0,001$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0,000$).

Πίνακας 6: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15 ημέρες και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

GSH($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0,261 \pm 0,018	0,082 \pm 0,008	0,020 \pm 0,001

Ιστός Σπλήνα→ Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση GSH (110%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($p=0.002$)

Πίνακας 7: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

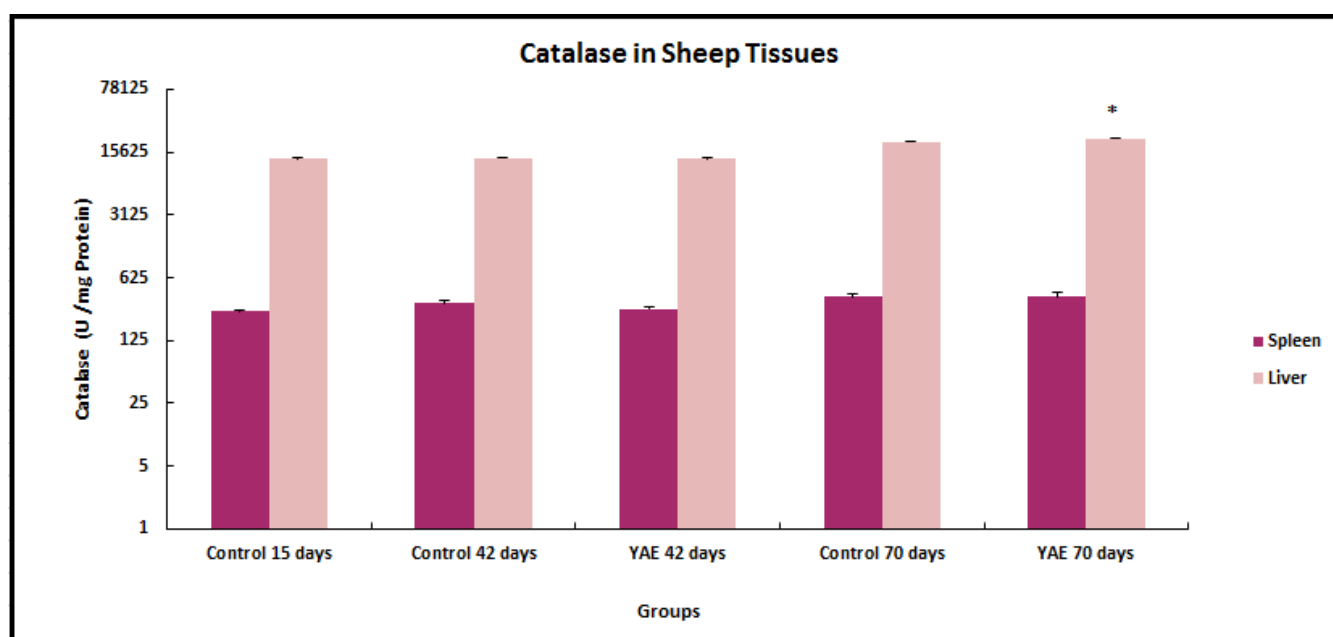
GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. \pm SEM	0.039 \pm 0.005	0.082 \pm 0.008

Στις 70 ημέρες παρατηρείται και πάλι μια στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH (150%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($p=0.000$)

Πίνακας 8: Τα επίπεδα δραστικότητας της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. \pm SEM	0.008 \pm 0.002	0.20 0.001

4.2.2. Αποτελέσματα Καταλάσης (CAT)



Διάγραμμα 13: Τα συνολικά επίπεδα δραστικότητας καταλάσης (U/mg πρωτεΐνης) σε ηπατικό ιστό και σε ιστό της σπλήνας, διαφορετικών ηλικιακών ομάδων προβάτων κρεατοπαραγωγής. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές $*p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Παρατηρήσεις:

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα της CAT, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.000$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.000$).

Πίνακας 9: Τα επίπεδα δραστικότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15,42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	13012,849±541,456	13339,004±255,060	20224,192±250,141

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες, παρατηρούμε επίσης ότι τα επίπεδα της CAT αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.000$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.000$).

Πίνακας 10: Τα επίπεδα δραστικότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15 ημέρες και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	13012,849±541,456	13005,043±339,850	21815,434±450,623

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή της CAT στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($p=0.450$)

Πίνακας 11: Τα επίπεδα δραστικότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. ± SEM	1339.004 ± 255.060	13005.043 ± 339.850

Στις 70 ημέρες παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση της CAT (7.87%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($p=0.018$)

Πίνακας 12: Τα επίπεδα δραστικότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	20224.192 ± 250.141	21815.434 ± 450.623

Ιστός Σπλήνα→Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα τηςCAT, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τις 15 ημέρες στις 42 ημέρες, ούτε από της 42 στις 70 ημέρες. Παρατηρείται όμως στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.038$).

Πίνακας 13: Τα επίπεδα δραστηκότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15,42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	262,727 ±9,300	325,106 ±27,933	385,809 ±34,464

Ιστός Σπλήνα→Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση της CAT από τις 42 ημέρες στις 70 ημέρες($p=0.003$) και από τις 15 στις 70 ημέρες($p=0.002$).

Πίνακας 14: Τα επίπεδα δραστηκότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15 ημέρες και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	262,727±9,300	279,910±17,820	384,809±36,826

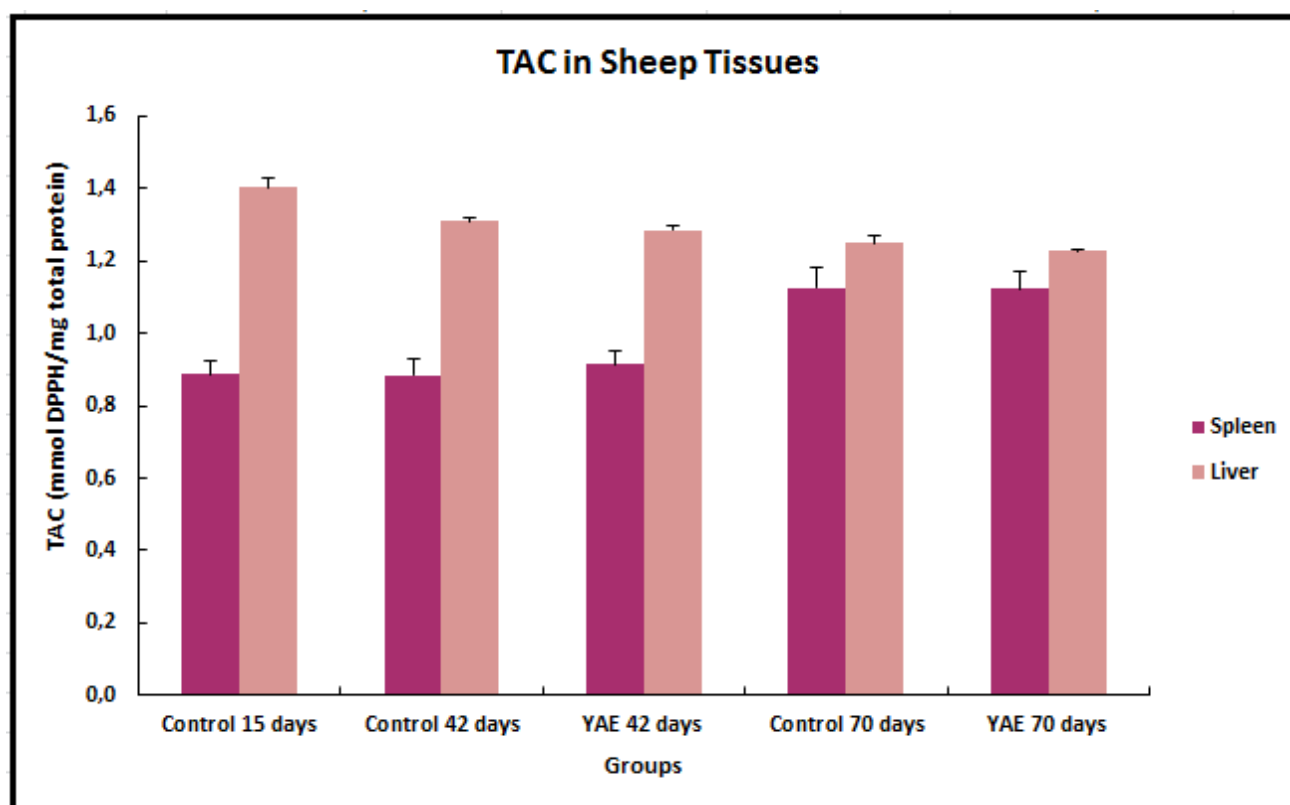
Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Παρατηρούμε ότι τόσο στις 42 ($p=0.202$) όσο και στις 70 ημέρες ($p=0.981$) δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της CAT από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.

Πίνακας 15: Τα επίπεδα δραστικότητας της CAT (U/mg πρωτεΐνης) **A)** στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες και **B)** στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

A	CAT (U/mg Protein)-ΗΠΑΡ	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
	M.O. ± SEM	325.1055 ± 27.93251	279.9102 ± 17.81975
B	CAT(U/mg Protein)-ΣΠΛΗΝΑ	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
	M.O. ± SEM	385.8093 ± 34.46355	384.8092 ± 22.03328

4.2.3. Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)



Διάγραμμα 14: Τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά mg συνολικής πρωτεΐνης, για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), σε ηπατικό ιστό και ιστό σπλήνα προβάτων κρεατοπαραγωγής, διαφορετικών ηλικιακά ομάδων.) Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Παρατηρήσεις:

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control

Όσον αφορά τα επίπεδα της TAC, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0.021$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.001$). Αντίθετα από της 42 στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Πίνακας 16: Τα επίπεδα της TAC, (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15,42 και 70 ημέρες.

TAC(mmolDPPH/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	1,405±0,025	1,309±0,011	1,249±0,021

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 ($p=0.000$), από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.028$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.000$).

Πίνακας 17: Τα επίπεδα της TAC, (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	1,405±0,025	1,285±0,014	1,227±0,005

Ιστός σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control

Όσον αφορά τα επίπεδα της TAC, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.015$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.028$). Αντίθετα από της 15 στις 42 ημέρες δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Πίνακας 18: Τα επίπεδα της TAC, (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15, 42 και 70 ημέρες.

TAC(mmolDPPH/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	0,886 ±0,039	0,885±0,047	1,126 ±0,058

Ιστός σπλήνα → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.003$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.003$). Αντίθετα από της 15 στις 42 ημέρες δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Πίνακας 19: Τα επίπεδα της TAC, (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CAT (U/mg Protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	0,886 ±0,039	0,914±0,039	1,122±0,049

Ηπατικός ιστός και Ιστός σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Παρατηρούμε ότι στις 42 και 70 ημέρες, και στους 2 ιστούς, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της TAC από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.

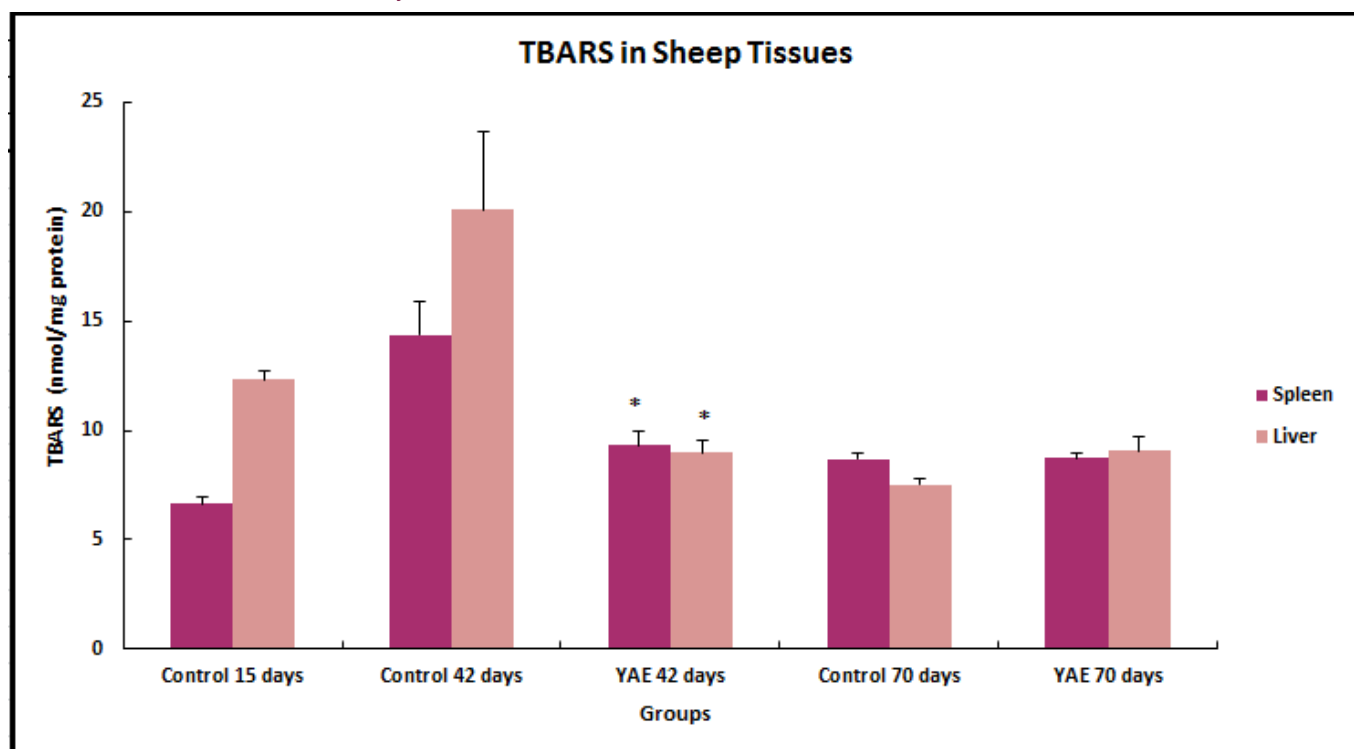
Σπλήνα: 42 ημέρες: $p=0.689$ και 70 ημέρες: $p=0,957$

Ήπαρ: 42 ημέρες: $p=0.198$ και 70 ημέρες: $p=0.403$

Πίνακας 20: Τα επίπεδα της TAC (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό **A)** των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες **B)** των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες. Τα επίπεδα της TAC (mmol DPPH/mg πρωτεΐνης) τον ιστό της σπλήνας **Γ)** των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες και τέλος στο **Δ)** των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες

A	TAC (mmol DPPH/mg protein) -ΉΠΑΡ	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
	M.O. ± SEM	1,382995 ± 0,078095	1,284683 ± 0,014148
B	TAC (mmol DPPH/mg protein)-ΉΠΑΡ	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
	M.O. ± SEM	1,248696 ± 0,021157	1,227151 ± 0,00503
Γ	TAC (mmol DPPH/mg protein) -ΣΠΛΗΝΑ	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
	M.O. ± SEM	0,885292 ± 0,0469908	0,9136954 ± 0,0391537
Δ	TAC (mmol DPPH/mg protein)-ΣΠΛΗΝΑ	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
	M.O. ± SEM	1,126202 ± 0,057717	1,122118 ± 0,049335

4.2.4. Αποτελέσματα TBARS



Διάγραμμα 15: Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) σε ηπατικό ιστό και σε ιστό της σπλήνας, διαφορετικών ηλικιακών ομάδων προβάτων κρεατοπαραγωγής διαφορετικών ηλικιακά ομάδων. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Παρατηρήσεις:

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση μόνο από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0,019$). Αντίθετα δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή ούτε από της 15 στις 42, ούτε από τις 15 στις 70 ημέρες.

Πίνακας 21: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15, 42 και 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	12,311±0,422	20,093±3,579	7,538±0,257

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0,017$) και από τις 15 σε σχέση με τις 70 ημέρες ($p=0,014$). Από τις 42 στις 70 ημέρες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πίνακας 22: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	12,311±0,422	8,997 ±0,545	9,046 ±0,669

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS (55,22%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($p=0.023$)

Πίνακας 23: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. ± SEM	20,093± 3,579075	8,996944± 0,545356

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (P=0,082)

Πίνακας 24: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
Μ.Ο. ± SEM	7,537674± 0,256671	9,045754±0,66932

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control για τα επίπεδα των TBARS, παρατηρήσαμε αρχικά στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 ημέρες στις 42 ημέρες (p=0,003) και μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 42 στις 70 ημέρες (p=0,020). Από τις 15 στις 70 ημέρες δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Πίνακας 25: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15, 42 και 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
Μ.Ο. ± SEM	6,638 ±0,337	14,359 ±1,541	8,704 ±0,279

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες των TBARS παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες (p=0,017). Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή από τις 42 στις 70 και από τις 15 στις 70 ημέρες.

Πίνακας 26: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	6,638 ±0,337	9,301±0,670	8,730±0,234

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS (35,22%) στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (p=0.025)

Πίνακας 27: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

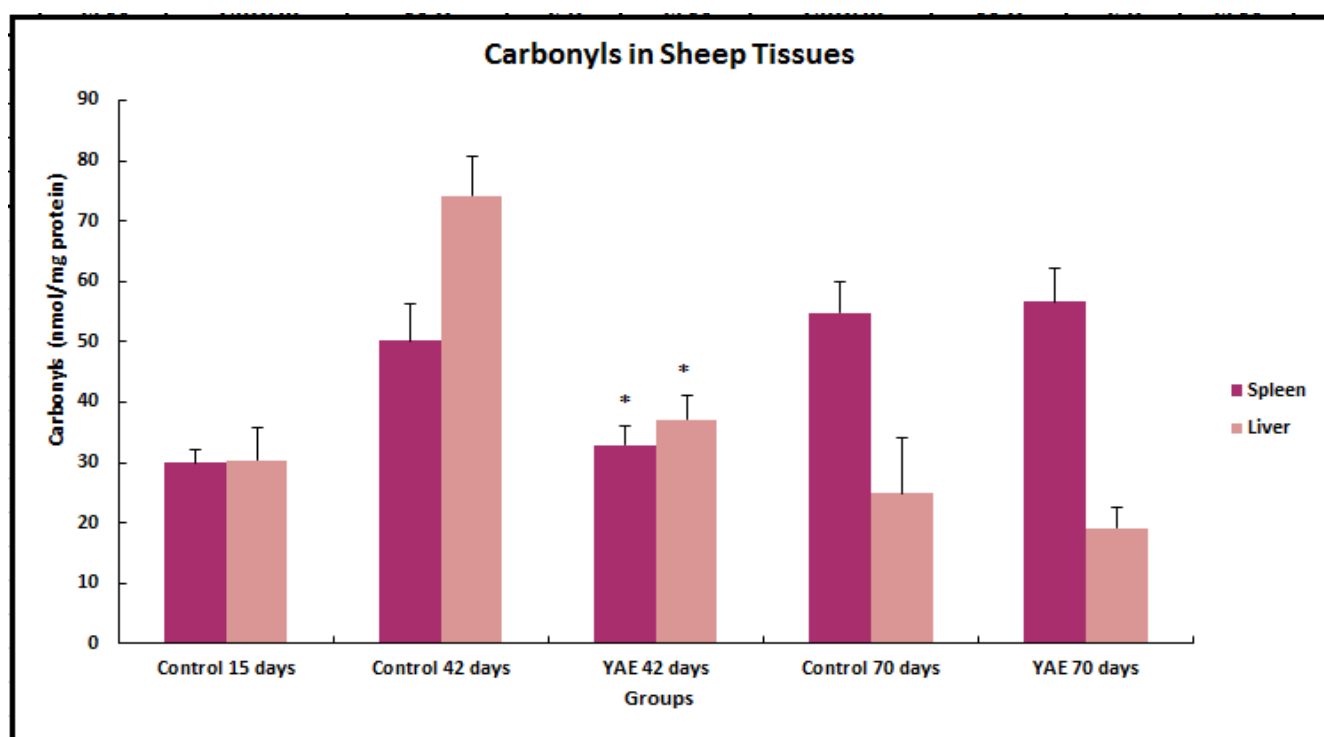
TBARS(nmol/mgprotein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. ± SEM	14,35912± 1,540549	9,301235± 0,669974

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (P=0,948)

Πίνακας 28: Τα Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων και 70 ημέρες.

TBARS(nmol/mgprotein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	8,704251± 0,279355	8,729999±0,234397

4.2.5. Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα16: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης), σε ηπατικό ιστό και ιστό σπλήνα προβάτων κρεατοπαραγωγής διαφορετικών ηλικιακά ομάδων.. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές * $p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας.

Παρατηρήσεις:

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες ($p=0.007$) και στατιστικά σημαντική μείωση από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.001$). Δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή από τις 15 στις 70 ημέρες.

Πίνακας 29: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15,42 και 70 ημέρες.

CARB(nmol/mg protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	30,330±5,373	74,239±6,530	24,887±9,175

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις δύο πολυφαινολικές ομάδες, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 ημέρες στις 70 ημέρες ($p=0,026$). Δεν παρατηρείται καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή από τις 15 στις 42 και 70 ημέρες αντίστοιχα.

Πίνακας 30: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CARB(nmol/mg protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	30,330±5,373	37,071 ±4,117	19,104 ±3,551

Ηπατικός ιστός → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση (50.07%) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (P=0,001)

Πίνακας 31: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. ± SEM	74,23946± 6,529579	37,07104± 4,116533

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (P=0,570)

Πίνακας 31: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ηπατικό ιστό των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	24,88677± 9,174966	19,10392± 3,551098

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control

Στις ομάδες control, τα επίπεδα των TBARS, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 ημέρες στις 70 ημέρες (p=0,020) , ενώ ούτε από τις 15 στις 42 ημέρες όπως επίσης ούτε από τις 42 στις 70 ημέρες παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Πίνακας 32: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15, 42 και 70 ημέρες.

CARB(nmol/mg protein)	Control 15 ημέρες	Control 42 ημέρες	Control 70 ημέρες
M.O. ± SEM	29,897±2,111	50,133±6,005	54,740±5,190

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων

Συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 70 ημέρες ($p=0.004$) και από τις 15 στις 70 ημέρες ($p=0.004$). Στατιστικά σημαντικές μεταβολές δεν παρατηρήθηκαν από τις 15 στις 42 ημέρες.

Πίνακας 33: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control στις 15 και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 και 70 ημέρες.

CARB(nmol/mg protein)	Control 15 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	29,897±2,111	32,925±3,180	56,640±5,591

Ιστός Σπλήνα → Σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση (34.33%) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. ($P=0,034$)

Πίνακας 34: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 42 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	Control 42 ημέρες	Υ.Α.Ε 42 ημέρες
M.O. ± SEM	50,13333± 6,005402	32,92484±3,180423

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. (P=0,817)

Πίνακας 33: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg συνολικής πρωτεΐνης) στον ιστό της σπλήνας των ομάδων control και των πολυφαινολικών ομάδων στις 70 ημέρες.

CARB (nmol/mg protein)	Control 70 ημέρες	Υ.Α.Ε 70 ημέρες
M.O. ± SEM	54,74006± 5,190257	56,64043± 5,591245

5. Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών προβάτων κρεατοπαραγωγής, Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», 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 υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Συνολικά είκοσι οχτώ (28) πρόβατα χρησιμοποιήθηκαν στα οποία έγιναν τρεις (3) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, και πιο συγκεκριμένα στις δέκα πέντε (15), σαράντα δύο (42) και εβδομήντα (70) ημέρες από τη γέννησή τους. Μέχρι και τις δέκα πέντε (15) ημέρες από τη γέννηση τους, τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα μέχρι και την εβδομηκοστή (70) ημέρα από τη γέννηση τους, όπου τα πρόβατα λάμβαναν αποκλειστικά το πειραματικό σιτηρέσιο.

Για να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των νεαρών προβάτων πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών του οξειδωτικού στρες τόσο στον ιστό του σπλήνα όσο και στον ηπατικό ιστό, μετά την χορήγηση ζωοτροφής ενισχυμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

- η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)
- η δραστικότητα της καταλάσης (CAT)
- η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity)
- οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
- τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC-Protein Carbonyls)

Παράλληλα, διεξήχθη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή τόσο του βασικού σιτηρέσιου της ομάδας control όσο και του σιτηρέσιου της ομάδας που ήταν εμπλουτισμένο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Γι' αυτό το λόγο, προσδιορίστηκε

η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες ABTS και DPPH. Τα αποτελέσματα που παρατηρήσαμε ήταν, όσον αφορά τη ρίζα του DPPH, η ζωτροφή με YAE παρουσίαζε σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ζωτροφή της ομάδας ελέγχου. Όσον αφορά τη ρίζα του ABTS παρατηρήσαμε και πάλι σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα για την ζωτροφή με YAE.

Κατά συνέπεια, με βάση τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, μας δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των προβάτων σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και της πολυφαινολικής ομάδας είτε ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Αρχικά ο πρώτος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η **γλουταθειόνη (GSH)**. Πιο συγκεκριμένα η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα από τη διατροφή αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et.al.) (HUGHES, 1964), ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Ha et al., 1999). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), στην παρούσα πειραματική διαδικασία, τα επίπεδά της βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στον ιστό της σπλήνα στις 42 ημέρες κατά 110% και στις 70 ημέρες κατά 149,96% στα πρόβατα της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα στον ηπατικό ιστό δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα πρόβατα της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με της ομάδας

ελέγχου τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες. Στις περισσότερες μελέτες που έγιναν τόσο σε άλλα ζώα όσο και σε άλλους ιστούς των ζώων η χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με Υ.Α.Ε είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα GSH. Αυτό δείχνει ότι τέτοιες εμπλουτισμένες ζωοτροφές μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης μέσω:

1. αύξησης της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μελέτες έχουν δείξει ότι δύο πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ και η ελευρωπαΐνη, αυξάνουν την έκφραση και τη δραστικότητα του ενζύμου της υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της άμεσης απομάκρυνσης των ROS. Με αυτό τον τρόπο συνεισφέρουν στη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης. (Gerasopoulos et al., 2015)

2. αύξησης ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH, όπως η λιγάση της γ-γλουταμινοκουστεΐνης (GCL) και η συνθετάση της γλουταθειόνης (Aquilano, Baldelli, & Ciriolo, 2014).

Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται μέσω ενός στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), που είναι μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar, Kim, More, Kim, & Choi, 2014).

3. αποθεματικής GSH που προέρχεται από την αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες με άμεση εξουδετέρωσή τους (Frankel et al., 2013; Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015).

Επιπλέον στον ηπατικό ιστό συγκρίνοντας τις ομάδες control μεταξύ τους αλλά και τις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH από τις 42 στις 70 ημέρες, κάτι που δείχνει ότι η GSH παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με το χρόνο. Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί, η χορήγηση πολυφαινολών σε κοτόπουλα είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να

παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με το χρόνο και στις control και στις πολυφαινολικές ομάδες. Ωστόσο οι τιμές είχαν μεγαλύτερη αύξηση στις πολυφαινολικές από ότι στις control ομάδες, το οποίο συνηγορεί το θετικό αποτέλεσμα των πολυφαινολών (Gerasopoulos, Stagos, Kokkas, et al., 2015). 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 (πολυφαινολική), 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.

Αντίθετα στον ιστό του σπλήνα είτε συγκρίνοντας τις ομάδες control μεταξύ τους είτε τις πολύ φαινολικές ομάδες μεταξύ τους παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42, από τις 42 στις 70 και από τις 15 στις 70 ημέρες. Σε παρόμοιες μελέτες που έγιναν σε άλλους ιστούς προβάτων και με τη διαφορά ότι η τροφή ήταν εμπλουτισμένη με στέμφυλα, παρατήρησαν επίσης μια μικρή μείωση. Μια εξήγηση για τη μείωση της GSH, που παρατηρήθηκε μπορεί να είναι ότι σε ηλικία 70 ημερών στον οργανισμό των προβάτων παρήχθησαν ενδογενή υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης, από τον ίδιο τον οργανισμό των ζώων χωρίς την χορήγηση πολυφαινολών. Έτσι, οι βιοχημικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση GSH όχι μόνο δεν αυξήθηκαν περαιτέρω μετά την χορήγηση Υ.Α.Ε ή στεμφύλων, αλλά μειώθηκαν (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015). Επιπλέον, έχουν επίσης δείξει ότι η συμπληρωματική μεθειονίνη, κύριος πρόδρομος της σύνθεσης GSH, αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με χαμηλή συγκέντρωση GSH αλλά μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κοτόπουλα πάχυνσης, με υψηλή GSH. (Chen, Chen, Zhang, & Zhou, 2013).

Ο επόμενος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η καταλάση(CAT). Είναι γνωστό ότι η μεγαλύτερη δραστηριότητα της CAT εντοπίζεται στο ήπαρ, αφού πρόκειται για ζωτικό όργανο του συστήματος της πέψης, που διασπά τα τοξικά υπεροξειδία του υδρογόνου, παράγοντας νερό και οξυγόνο. Όσον αφορά την αξιολόγηση από τις

μετρήσεις μας για τη δραστικότητα της καταλάσης, στον ηπατικό ιστό στις 70 ημέρες παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση 7.87% της CAT στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control. Αντίθετα στον ιστό της σπλήνας δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές μεταβολές. Γενικότερα σε παρόμοιες μελέτες που έγιναν σε όλους τους ιστούς (εκτός του ήπατος), είτε με άλλα ζώα, είτε με ζώα που εκτρέφονταν με τροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην δραστικότητα της CAT. Στον ηπατικό ιστό τα επίπεδα της CAT, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 42 στις 70 ημέρες κατά τη σύγκριση των ομάδων ελέγχου ενώ κατά την σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων, ότι τα επίπεδα της CAT αυξάνονται στατιστικά σημαντικά τόσο από τις 42 στις 70 όσο και από τις 15 στις 70 ημέρες. Οι τιμές είχαν λίγο μεγαλύτερη αύξηση στις πολυφαινολικές από ότι στις control ομάδες. Όσον αφορά τον ιστό της σπλήνας κατά τη σύγκριση των ομάδων ελέγχου παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 70 ημέρες, ενώ κατά την σύγκριση των πολυφαινολικών ομάδων μεταξύ τους παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της CAT από τις 15 και 42 στις 70 ημέρες. Από όλα τα προηγούμενα βλέπουμε ότι η CAT παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με το χρόνο και στις control και στις πολυφαινολικές ομάδες που σημαίνει ότι τα νεαρότερα ζώα παρουσιάζουν μικρότερη δράση της καταλάσης και άρα έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Ακολούθως μετρήθηκε η Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο 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. Κατά την αξιολόγηση από τις μετρήσεις μας για την TAC

παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα control ζώα στα πολυφαινολικά.

Στον ηπατικό ιστό η σύγκριση μεταξύ των ομάδων ελέγχου έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42 και 70 ημέρες, ενώ η σύγκριση μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση από τις 15 στις 42, από τις 42 στις 70 και από τις 15 στις 70 ημέρες. Στον ιστό της σπλήνας παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 και 42 στις 70 ημέρες κατά τη σύγκριση τόσο ομάδων ελέγχου, όσο και πολυφαινολικών ομάδων.

Σε άλλες μελέτες σε κοτόπουλα, βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ήταν αυξημένη και μάλιστα μεγαλύτερη για τις πολυφαινολικές ομάδες (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015). Όπως γνωρίζουμε η TAC αναφέρεται στην αντιοξειδωτική ικανότητα αρκετών αντιοξειδωτικών μορίων. Η GSH αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ωστόσο η TAC δεν αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αύξηση της GSH μπορεί να λειτουργεί σαν αντιστάθμισμα της μείωσης άλλων αντιοξειδωτικών μορίων.

Στην συνέχεια μετρήσαμε την υπεροξειδωση λιπιδίων (TBARS). Η υπεροξειδωση λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροστάνια) προϊόντων της υπεροξειδωσης. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των TBARS στον ηπατικό ιστό στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση κατά 55,22% στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Στον ιστό της σπλήνα στις 42 ημέρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS κατά 35,22% στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Η μείωση των επιπέδων TBARS στον σπλήνα μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση της GSH η οποία συνέβαλε στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα τη μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες συμβάλουν στην μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων

(Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015). Στο ήπαρ παρ' ότι δεν υπήρχε αύξηση της GSH, αυξήθηκε η καταλάση στην πολυφαινολική ομάδα και άρα και σε αυτό μπορεί να οφείλεται η προστασία από τη λιπιδική υπεροξειδωση. Παρατηρούμε λοιπόν ότι γενικότερα τα TBARS, ήταν σημαντικά μειωμένα στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με τις control. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοίρους, μειώθηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών είτε βρίσκονται στα YAE είτε στα στέμφυλα. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η πολυφαινολική ομάδα σε όλους τους ιστούς παρουσιάζει μειωμένες τιμές στα TBARS, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μικρότερη οξείδωση στα λιπίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπεροξειδίωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας του κρέατος, καθώς και στην παραγωγή διάφορων τοξικών ενώσεων (Rey et al., 2001). Ειδικότερα, η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Nam & Ahn, 2003). Έτσι, η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος (Arshad et al., 2013).

Στον ηπατικό ιστό συγκρίνοντας τις ομάδες control παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση από τις 42 στις 70 ημέρες ενώ συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των TBARS μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 στις 42 και 70 ημέρες. Όσον αφορά τον ιστό της σπλήνας παρατηρήσαμε αρχικά στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες και μια στατιστικά σημαντική μείωση από τις 42 στις 70 ημέρες. Επιπλέον συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες. Γενικότερα η αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση στα πιο νεαρά ζώα δείχνει ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε αυτά δεν είναι τόσο ισχυροί και άρα έχουν και μεγαλύτερη ανάγκη από χορήγηση αντιοξειδωτικών.

Τέλος, η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξειδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση διαφόρων αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν στον ηπατικό ιστό, στις 42 ημέρες παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική μείωση κατά 50.07% στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα control, ενώ στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήσαμε και στον ιστό της σπλήνας όπου στις 42 ημέρες είχαμε μια στατιστικά σημαντική μείωση κατά 34.33%. Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι στο σύνολο των δύο ιστών, η πολυφαινολική ομάδα εμφανίζει μειωμένη οξειδωση πρωτεϊνών, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σε άλλες εργασίες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαν αυξημένες τιμές στις ομάδες control σε σχέση με τις πολυφαινολικές, ενώ με το πέρας των ημερών παρουσιάστηκε συνεχής μείωση στις πολυφαινολικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες αποτρέπουν την οξείδωση των πρωτεϊνών (Gerasopoulos et al., 2015). Έχει προταθεί ότι η διάσπαση του H_2O_2 από σίδηρο ή χαλκό είναι μια σημαντική πηγή $OH\bullet$ που μπορούν να οξειδώσουν τα υπολείμματα αμινοξέων στις πρωτεΐνες και οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Stadtman & Levine, 2003). Έτσι, πολυφαινόλες που βρίσκονται στα στέμφυλα μπορούν να αναστέλλουν αυτές τις αντιδράσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό πρωτεϊνών και συσσωμάτωση, επηρεάζοντας έτσι την πεπτικότητα τους, η οποία μειώνει τη θρεπτική αξία των τροφών (Chen et al., 2013). Σε σχέση με το χρόνο όταν συγκρίνουμε τις ομάδες control στον ηπατικό ιστό, παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 42 ημέρες και στατιστικά σημαντική μείωση από τις 42 στις 70 ημέρες. Όταν συγκρίνουμε τις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων μειώνονται στατιστικά σημαντικά από τις 42 στις 70 ημέρες. Όσον αφορά τον ιστό της σπλήνας τα επίπεδα των καρβονυλίων, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση από τις 15 στις 70 ημέρες ενώ όταν συγκρίνουμε τις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων αυξάνονται στατιστικά σημαντικά από τις 15 και τις 42 στις 70

ημέρες. Γενικότερα και στους δύο ιστούς παρατηρούμε ότι χρονικά τα επίπεδα καρβονυλίων αυξάνονται μέχρι τις 42 ημέρες αλλά μειώνονται από τις 42 μέχρι τις 70 ημέρες, κάτι που ίσως να οφείλετε στο ότι, όσο μικρότερη είναι η ηλικία των προβάτων τόσο μεγαλύτερη είναι και η επιβάρυνση που υφίστανται από το οξειδωτικό στρες, γι' αυτό και βλέπουμε αυτές τις μεταβολές. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδεχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, χωρίς να είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένης δράσης οξειδωτικού και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως δείκτης συνολικής οξειδωσής των πρωτεϊνών. Γενικώς, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της θρεπτικής τους αξίας (Lund, Heinonen, Baron, & Estevez, 2011; Villaverde, Morcuende, & Estevez, 2014).

Συμπερασματικά, οι ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα ελαιολιβερού παρουσιάζουν μια υψηλή αντιοξειδωτική δράση η οποία βελτιώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ των προβάτων και κατ' επέκταση ενισχύει την άμυνα τους έναντι σε οξειδωτικούς παράγοντες στους οποίους εκτίθενται καθημερινά. Τέλος είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι παράλληλα με την βελτίωση του αντιοξειδωτικού προφίλ των προβάτων επιτυγχάνεται η αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιολιβερού. Η επεξεργασία τους μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται απ' την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

6. Βιβλιογραφία

Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory*

- Sciences*, 44(5-6), 483–525. <http://doi.org/10.1080/10408360701612942>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N., ... Kouretas, D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 60–68. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.029>
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V, Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 49(1), 345–353. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059>
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 196. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>
- Arshad, M. S., Anjum, F. M., Khan, M. I., Shahid, M., Akhtar, S., & Sohaib, M. (2013). Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 164. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-12-164>
- Baliga, M. S., Haniadka, R., Pereira, M. M., D'Souza, J. J., Pallaty, P. L., Bhat, H. P., & Popuri, S. (2011). Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 499–523. <http://doi.org/10.1080/10408391003698669>
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23. <http://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>
- BEERS, R. F. J., & SIZER, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–140.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., & Visioli, F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, 190(1), 181–186. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.011>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <http://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J. P., & Seve, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2256–2262.
- Camire, M. (2002). *Phytochemicals in the Vaccinium family: bilberries, blueberries, and cranberries. Phytochemicals in nutrition and health*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cJHsMALUDjOC&oi=fnd&pg=PA19&dq=phytochemicals+and+diabetes&ots=gJWBqxpTyh&sig=TGxwoUqe9ftiFUpcPb1WIMVeE>

- Castaner, O., Fito, M., Lopez-Sabater, M. C., Poulsen, H. E., Nyyssonen, K., Schroder, H., ... Covas, M.-I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *30*(4), 490–493. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.01.013>
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*(3), 481–493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *61*(2), 192–208. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chen, Y. P., Chen, X., Zhang, H., & Zhou, Y. M. (2013). Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. *British Poultry Science*, *54*(4), 531–537. <http://doi.org/10.1080/00071668.2013.809402>
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(3), 218–236. <http://doi.org/10.1080/10408390701856223>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(10), 1195–1214. <http://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Covas, M.-I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., ... Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *145*(5), 333–341.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342. <http://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, *65*(4), 337–353.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, *59*(4), 459–469.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, *411*(6835), 342–348. <http://doi.org/10.1038/35077213>
- Fito, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Marti, J., Alcantara, M., Pujadas-Bastardes, M., ... Covas, M. I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, *181*(1), 149–158. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.036>
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(22), 5179–5188. <http://doi.org/10.1021/jf400806z>

- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., Kokkas, S., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and Chemical Toxicology*, *86*, 319–327. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.007>
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., ... Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *22*(1), 90–95. <http://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7>
- Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, *383*(3-4), 375–388. <http://doi.org/10.1515/BC.2002.042>
- Gordon, T., Kannel, W. B., Castelli, W. P., & Dawber, T. R. (1981). Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Archives of Internal Medicine*, *141*(9), 1128–1131.
- Guiso, M., & Marra, C. (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural Product Research*, *19*(2), 105–109. <http://doi.org/10.1080/14786410410001696147>
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*(12 Pt 2), 1819–1828.
- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., ... Cobbett, C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, *11*(6), 1153–1164.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, *18*(9), 685–716.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1–85.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, *8*(9), 950–988. <http://doi.org/10.3390/i8090950>
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(26), 9966–9977. <http://doi.org/10.1021/jf061478a>
- Hart, J. H., & Hillis, W. E. (1974). Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytopathology*. <http://doi.org/10.1094/Phyto-64-939>
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., ... Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, *155*(4), 381–386.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *58*(11-12), 879–884.

- Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J., & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, *76*(3), 986–993. <http://doi.org/10.1128/IAI.01063-07>
- Jain, A., & Flora, S. J. S. (2012). Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, *33*(2), 233–238.
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *62*(3), 231–236.
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, *128*, 749–758. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.027>
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *28*(2), 141–143.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., ... Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *12*(1), 67–75. <http://doi.org/10.1097/01.cej.0000051106.40692.d3>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 540S–542S.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, *113* Suppl , 71S–88S.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., ... Gansler, T. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *62*(1), 30–67. <http://doi.org/10.3322/caac.20140>
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., & Amendola, V. (2006). *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*. *Phytochemistry* (Vol. 661).
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(1), 83–95. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *173*(3), 502–511.

<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Medina, E., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4954–4961. <http://doi.org/10.1021/jf0602267>
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 326S–329. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/81/1/326S>
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebozinska, E., & Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812–2823. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77620-1](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1)
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Science*, 63(1), 1–8.
- Nicolaiew, N., Lemort, N., Adorni, L., Berra, B., Montorfano, G., Rapelli, S., ... Jacotot, B. (1998). Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 42(5), 251–260.
- Of, A., Medicine, H., & Harman, D. (2009). REVIEW Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία. *Archives of Hellenic Medicine*.
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/194586>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Ramirez-Tortosa, C., Lopez-Pedrosa, J. M., Suarez, A., Ros, E., Mataix, J., & Gil, A. (1999). 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. *The British Journal of Nutrition*, 82(1), 31–39.
- Reinisch, N., Kiechl, S., Mayr, C., Schratzberger, P., Dunzendorfer, S., Kahler, C. M., ... Wiedermann, C. J. (1998). Association of high plasma antioxidant capacity with new

- lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study. *European Journal of Clinical Investigation*, 28(10), 787–792.
- Rey, A. I., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Lopez-Bote, C. J., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of Animal Science*, 79(5), 1201–1208.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545–89. <http://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 304–317.
- Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., ... Palli, D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *The British Journal of Nutrition*, 95(4), 742–751.
- Schwartz, G. G. (2014). Vitamin D in blood and risk of prostate cancer: lessons from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial and the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(8), 1447–1449. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0520>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 5(3), 237–245.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 31S–38S.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Villaverde, A., Morcuende, D., & Estevez, M. (2014). Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of Food Science*, 79(7), C1331–42. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12481>
- Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 60–64. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735>
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., ... Galli, C. (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, 44(2), 121–127.

<http://doi.org/10.1007/s00394-004-0504-0>

- Vissers, M. N., Zock, P. L., Wiseman, S. A., Meyboom, S., & Katan, M. B. (2001). Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(5), 334–341. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601161>
- Wang, Z.-H., Gao, Q.-Y., & Fang, J.-Y. (2012). Green tea and incidence of colorectal cancer: evidence from prospective cohort studies. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1143–1152. <http://doi.org/10.1080/01635581.2012.718031>
- Weinbrenner, T., Fito, M., de la Torre, R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., ... Covas, M.-I. (2004). Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2314–2321.
- Weisburger, J. H. (2001). Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(10), 891–897.
- Weiss, W. P., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (2004). Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 87(1), 32–37. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73138-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73138-0)
- Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England)*, 344(8925), 793–795.
- World Cancer Research Fund, & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Cancer Research*.
- Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., ... Imai, K. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*, 83(1), 35–44. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.002>
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.
- ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ(καθηγητής)
- Αθ.Σμοκοβίτη: Φυσιολογία, έκδοση 2007
- DANIEL L. GILBERT, January 2000, Fifty Years of Radical Ideas
- Halliwell B., Gutteridge J., 1999, Journal Article, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview
- R. W. SCHOLZ, K. S. GRAHAM, E. GUMPRICHT, C. C. REDDY, December 1989, Mechanism of Interaction of Vitamin E and Glutathione in the Protection against Membrane Lipid Peroxidation
- Bradford M. M. 1976 A rapid sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Kataria, A.K., Kataria, N., 2012b. Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever. *Porc Res.* 2(2), pp.35-38.

Kataria A. K.Kataria N., *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, № 4 / том 8 / 2012, EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN SHEEP AFFECTED WITH PESTE DES PETITS RUMINANTS

Wayne R. Bidlack, Stanley T. Omaye, Mark S. Meskin, Debra K.W. Topham, March 16, 2000, "Phytochemicals as Bioactive Agents"

Mark S Meskin, Wayne R Bidlack, Audra J Davies, and Stanley T Omaye, 2002, *Phytochemicals in Nutrition and Health*

Athina Papadopoulou, Richard A. Frazier, Characterization of protein–polyphenol interactions *Trends in Food Science & Technology*, Volume 15, Issues 3–4, March–April 2004, Pages 186–190.

Francisco A Tomás-Barberán, Michael N Clifford, 15 May 2000, Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden

Michael N Clifford, 15 May 2000, Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden

Takako Yokozawa, Eun Ju Cho, Chan Hum Park, and Ji Hyun Kim, Protective Effect of Proanthocyanidin against Diabetic Oxidative Stress, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan 2Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea, (Received 28 April 2011; Revised 1 June 2011; Accepted 9 June 2011).

Silage fermentation processes and their manipulation - Stefanie J.W.H. Oude Elferink, Frank Driehuis, Jan C. Gottschal, and Sierk F. Spoelstra, 2008

Reddy, Y N, Murthy, S V, Krishna, D R, Prabhakar, M C, "Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients", *Indian Journal of Tuberculosis*. 2004 Oct; 51(4): 213-218.

Elizabeth M. Boon, Aaron Downs, David Marcey, David Marcey, 2001, Catalase:H₂O₂ Oxidoreductase

R. W. SCHOLZ, K. S. GRAHAM, E. GUMPRICHT, C. C. REDDY, Mechanism of Interaction of Vitamin E and Glutathione in the Protection against Membrane Lipid Peroxidation, December 1989.

Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.