

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΝΤΟΝΤΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΙΣΤΟΥΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ, ΚΟΤΟΠΟΥΛΩΝ
ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΟΣΙΜΟΥ
ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΑΠΟ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ**

2018

1

**Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ιστούς
στομάχου και σπλήνα, κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, μετά
από χορήγηση πόσιμου νερού με πολυφαινολικό εκχύλισμα
από απόβλητα ελαιοτριβείου**

**Assessment of oxidative stress markers in stomach and
spleen tissues of broiler chickens after the administration of
drinking water enriched with polyphenolic extracts from
olive mill waste waters**

Τριμελής Επιτροπή

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

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

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

Ευχαριστίες:

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του οποίου είναι ο διευθυντής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον διδάκτορα Κωνσταντίνο Γερασόπουλο για την πολύτιμη καθοδήγηση και συνεισφορά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	11
1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	12
1.1.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	15
1.1.3. Δημιουργία ελευθέρων ριζών.....	16
1.2 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	18
1.3 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	22
1.4 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	24
1.5 Πολυφαινόλες.....	24
1.5.1 Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών.....	24
1.5.2. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	27
1.5.4. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.....	27
1.6 Σκοπός.....	30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος.....	31
2.2. Πειραματόζωα – Χορήγηση Πολυφαινολών.....	33
2.3. Περιγραφή Σητηρεσίου - Βάρη.....	34
2.4. Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση.....	35
2.4.1. Ιστοληψία και μεταφορά.....	35
2.4.2. Ομογενοποίηση.....	35
2.5. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	36
2.5.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH).....	36
2.5.2. Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H ₂ O ₂	40
2.5.3. Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).....	41
2.5.4. Μέτρηση TBARS.....	44
2.5.5. Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.....	46
2.5.6. Μέθοδος Bradford.....	49
2.6. Στατιστική Ανάλυση.....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
3.1. GSH.....	50
3.2. Καταλάση.....	51
3.3. TAC.....	52
3.4. TBARS.....	53
3.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.	Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα.	12
Εικόνα 2.	Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.	13
Εικόνα 3.	Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.	17
Εικόνα 4.	Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.	17
Εικόνα 5.	Δημιουργία οξειδωτικού στρες.	19
Εικόνα 6.	Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.	21
Εικόνα 7.	Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.	22
Εικόνα 8.	Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.	23
Εικόνα 9.	Κατηγορίες πολυφαινολών.	26
Εικόνα 10.	Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.	27
Εικόνα 11.	Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.	31
Εικόνα 12.	Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.	33
Εικόνα 13.	Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.	36
Εικόνα 14.	Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.	37
Εικόνα 15.	Φάσμα απορρόφησης του 2-Nitro-5-thiobenzoic οξέος. (DojindoMolecularTechnologies).	39
Εικόνα 16.	Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), Που Οδηγεί Στην Παραγωγή Του Μορίου TBA-MDA.	44
Εικόνα 17.	Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.	13
Πίνακας 2.	Δραστικές Μορφές Αζώτου.	15
Πίνακας 3.	Σύσταση των Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων	29
Πίνακας 4.	Συγκεντρώσεις Φαινολικών Συστατικών του Κατσίγαρου	30
Πίνακας 5.	Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων.	33
Πίνακας 6.	Σύσταση σιτηρεσίου.	34
Πίνακας 7.	Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων.	34
Πίνακας 8.	Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή.	35
Πίνακας 9.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.	38
Πίνακας 10.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση του ρυθμού διάσπασης H ₂ O ₂ .	40
Πίνακας 11.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.	43
Πίνακας 12.	Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/mg protein)	50
Πίνακας 13.	Αύξηση %GSH Σπλήνας σε σχέση με Control.	50
Πίνακας 14.	Αύξηση % GSH Στομαχικού σε σχέση με Control.	50
Πίνακας 15.	Αύξηση % GSH Σπλήνας σε σχέση με Β ομάδα	50
Πίνακας 16.	Αύξηση % GSH Στομαχικού σε σχέση με Β ομάδα	50
Πίνακας 17.	Αποτελέσματα μετρήσεων του Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ (U/mg protein).	51
Πίνακας 18.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Σπλήνας σε σχέση με Control.	51
Πίνακας 19.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Στομαχικού σε σχέση με Control.	51
Πίνακας 20.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Σπλήνας της ομάδας C σε σχέση με Β ομάδα.	51
Πίνακας 21.	Αύξηση % Ρυθμού Διάσπασης H ₂ O ₂ Στομαχικού της ομάδας C σε σχέση με Β ομάδα.	51
Πίνακας 22.	Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/mg protein).	52
Πίνακας 23.	Αύξηση % TAC Σπλήνας σε σχέση με Control.	52
Πίνακας 24.	Αύξηση % TAC Στομαχικού σε σχέση με Control.	52
Πίνακας 25.	Αύξηση % TAC Σπλήνας της ομάδας C σε σχέση με Β ομάδα.	52
Πίνακας 26.	Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol /mgprotein).	53
Πίνακας 27.	Μείωση % TBARS Σπλήνας σε σχέση με Control.	53
Πίνακας 28.	Μείωση % TBARS Στομαχικού σε σχέση με Control.	53
Πίνακας 29.	Μείωση % TBARS Σπλήνας της ομάδας C, σε σχέση με Β ομάδα	53
Πίνακας 30.	Αποτελέσματα μετρήσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. (nmol /mgprotein).	54
Πίνακας 31.	Μείωση % καρβονυλίων Σπλήνας σε σχέση με Control.	54

Πίνακας 32.	Μείωση % καρβονυλίων Στομαχικού σε σχέση με Control.	54
Πίνακας 33.	Μείωση % καρβονυλίων Σπλήνας της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα	54
Πίνακας 34.	Μείωση % καρβονυλίων Στομαχικού της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1.	GSH στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	48
Γράφημα 2.	Ρυθμός Διάσπασης H ₂ O ₂ στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	49
Γράφημα 3.	TAC στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	50
Γράφημα 4.	TBARS στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	51
Γράφημα 5.	Καρβονύλια στον Ηπατικό και Καρδιακό ιστό των Κοτόπουλων.	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει σημειωθεί κυριολεκτικά μία έκρηξη στην παραγωγή διατροφικών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Η αιτία είναι το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, στο οποίο αποδίδεται βάσει μελετών, μεγάλης έκτασης βιοδραστικότητα. Είναι αξιοσημείωτο πως στην τελευταία δεκαετία, ο αριθμός των μελετών που αφορά στη βιοδραστικότητα του ελαιολάδου και των αποβλήτων της επεξεργασίας του, φθάνει πάνω από 700. Αυτό σημαίνει πως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι πολύ μεγάλο, όσον αφορά στο πολυφαινολικό προφίλ του ελαιολάδου και των αποβλήτων του, στο οποίο αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που πιθανόν να σχετίζονται με την πρόληψη ασθενειών. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα, από την επεξεργασία του υδατικού κλάσματος, που προκύπτει από τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά, προστίθενται στο πόσιμο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε ιστούς στομάχου και σπλήνας, κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους. Στη διατροφή τους υπήρχε το προβλεπόμενο σιτηρέσιο, αλλά στο πόσιμο νερό τους προστέθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα σε μορφή σκόνης. Τα κοτόπουλα χωρίστηκαν σε τρεις (3) ομάδες των δώδεκα (12) πτηνών. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου. Στις άλλες δύο (2) ομάδες, όπως αναφέρθηκε, στο νερό τους το οποίο ανανεώνονταν καθημερινά, μετά την ηλικία των δεκαπέντε (15) ημερών, προστέθηκε πολυφαινολική σκόνη που παράγεται από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Μετά το πέρας εξήντα (60) ημερών, όταν δηλαδή τα κοτόπουλα έκαναν αγωγή πολυφαινολών για σαράντα πέντε μέρες (45), οδηγήθηκαν στο πτηνοσφαγείο. Μετά τη θανάτωσή τους πραγματοποιήθηκε η λήψη στομαχικού ιστού και σπλήνας, από δώδεκα (12) κοτόπουλα από την κάθε ομάδα. Μετά την ομογενοποίηση των ιστών, προσδιορίστηκε η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 , τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά όσον αφορά την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κοτόπουλων μετά τη χορήγηση των πολυφαινολικών πρόσθετων. Συγκεκριμένα, στην ομάδα των 50μg/ml, τόσο στον στομαχικό ιστό όσο και στο σπλήνα, αυξήθηκε η γλουταθειόνη, που είναι το σημαντικότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό, με ποσοστά 80,7% και 78,3% αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζουν όλοι οι δείκτες και στους δύο ιστούς, συγκρίνοντας τις πολυφαινολικές ομάδες με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, στον σπλήνα είχαμε αύξηση της GSH, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, στην Β ομάδα 36,14% και στην Γ ομάδα 78,31%. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στον στομαχικό ιστό κατά 44,67% και 80,67% αντίστοιχα. Στο ρυθμό διάσπασης του H_2O_2 είχαμε αύξηση στην Β ομάδα κατά 79,18% και στην Γ ομάδα κατά 155,4% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όσο αναφορά την σπλήνα ενώ στον στομαχικό είχαμε αύξηση στην Β ομάδα κατά 172,9% και στην Γ ομάδα κατά 256,2% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Κατά την μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC) είχαμε αύξηση στην σπλήνα, στην Β ομάδα 16,57% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ενώ στην Γ ομάδα είχαμε αύξηση 35,47%. Στον στομαχικό είχαμε αύξηση κατά 21,86% στην Β ομάδα ενώ στην Γ ομάδα είχαμε αύξηση 27,58%. Στην μέτρηση των TBARS είχαμε μείωση στην σπλήνα στην Β ομάδα 34,01% ενώ στην Γ ομάδα 41,64% και μείωση στον στομαχικό στην Β ομάδα 19,23% ενώ στην Γ ομάδα 30,12%

σε σχέση πάντα με την ομάδα ελέγχου. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαμε μείωση στην σπλήνα στην Β ομάδα 23,83% και στην Γ ομάδα 38,53%, ενώ στον στομαχικό είχαμε μείωση στην Β ομάδα 21,68% και στην Γ ομάδα 38,68%.

Κατά συνέπεια, η παρουσία πολυφαινολών στο πόσιμο νερό έχει ευεργετικές ιδιότητες, βελτιώνοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής.

ABSTRACT

For several years, there has been a sudden increase in the generation of plant origin food products. The reason is basically their polyphenolic content, which exhibits important bioactivities. It is remarkable that the last decade the number of studies, on the bioactivity of olive oil and olive mill waste waters (OMWW) is about 700. This indicates that there is great interest on the polyphenolics of olive oil and OMWW. This interest is basically due to the olive oil's polyphenols which have strong antioxidant properties, and so they may be used for the prevention of oxidative stress-induced diseases.

The present study is the first in which polyphenolic powder was added to the broiler chickens' water. The aim of the study was to assess the effect on the antioxidant status by measuring oxidative stress biomarkers in tissues of broiler chickens, in which polyphenolic powder from processed OMWW dissolved in drinking water was administered.

The chickens were divided into three (3) groups of twelve (12) subjects. Group A was the control group, in which drinking water without was administered without polyphenols throughout the experiment. In the other two (2) groups, polyphenolic powder dissolved in drinking water at two different concentrations was administered. After the age of sixty days (60), the chickens were slaughtered. Stomach and spleen tissue were collected from twelve (12) subjects from each group. After tissues' homogenization, biochemical analysis was performed for measuring reduced glutathione (GSH), catalase activity, total antioxidant capacity (TAC), TBARS and protein carbonyls.

To sum up, the results of the present study were positive and encouraging. The administration of polyphenolic additives dissolved in drinking water to chickens improved the oxidative stress biomarkers compared to control group. For example, in group C (50 µg/ml), GSH in both stomach and spleen tissue was increased by 80.7% and 78.3% respectively compared to control. In the spleen, there was an increase in GSH, relative to the control group, in the B group of 36.14% and in the C group of 78.31%. Similarly in stomach tissue, there was an increase by 44.67% and 80.67% respectively. At the rate of H₂O₂ decomposition there was an increase in the B group by 79.18% and in the C group by 155.4% relative to the control group, while in the stomach there was an increase in the B group by 172.9% and in C group by 256.2% relative to the control group. In the total antioxidant capacity (TAC), there was an increase in spleen by 16.57% in the B group compared to the control group, while in the C group there was an increase by 35.47%. In stomach there was an increase by 21.86% in group B, while in group C an increase by 27.58%. In the TBARS, there was a reduction in the spleen in the B group by 34.01%, while in the C group by 41.64%. In the stomach there was in the B group a decrease by 19.23%, while in the C group by 30.12% compared to the control group. The protein carbonyls exhibited 23.83% reduction in the spleen in the B group and 38.53% in the C group, while in the stomach there was a decrease in the B group by 21.68% and in the C group by 38.68%.

Consequently, the presence of polyphenols in the drinking water had beneficial properties, improving the redox status in broiler chickens.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

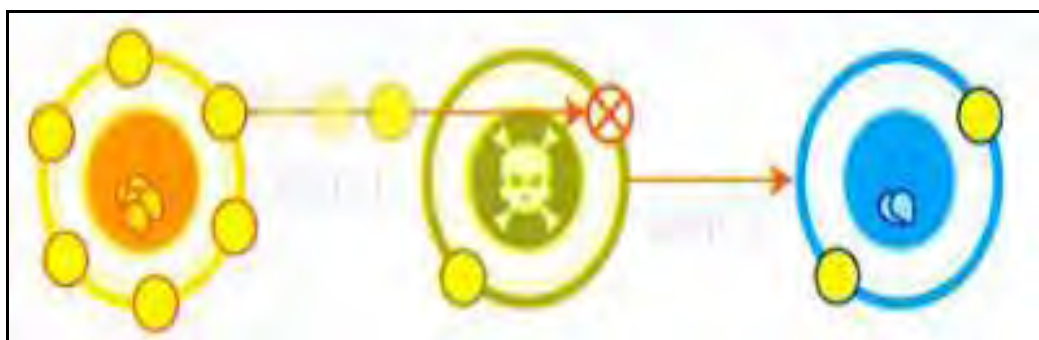
Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (*Lander H M 1997*).

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις).

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. Ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή

μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (*Halliwell & Gutteridge 1990*). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ενεργειακών συστημάτων να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (*Sengupta et al. 2004; Pani et al. 2010; AICR 2007*), το θείο (*Battin & Brumaghim 2009; Pani et al. 2010*) ή τον άνθρακα.



Εικόνα 1. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα.

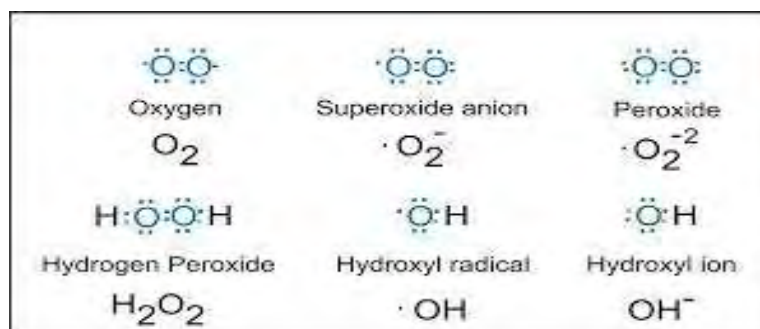
1.1.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου 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 για αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.

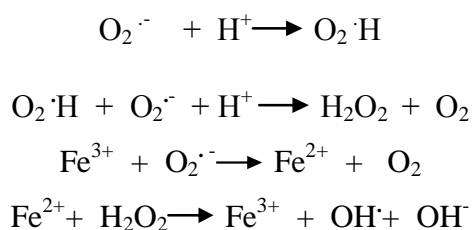


Εικόνα 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

Ανιόν σουπεροξειδίου: Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου. Είναι ιδιαίτερα τοξικό και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από την οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης εισβαλόντων παθογόνων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από το σύμπλεγμα I και II. Παράγεται επίσης και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ

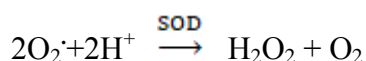
(Muller et al. 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξείδιο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

Ρίζα υδροξυλίου: Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Hayyanetal. 2016). Η ρίζα υδροξυλίου 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 and 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 τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Υπεροξείδιο υδρογόνου: Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου :



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10 μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το $\text{OH}\cdot$. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, $-\text{SH}$ ομάδων και κετοξέων. Επίσης, έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στον οργανισμό μοντέλο ψάρι ζέβρα, έδειξε ότι μετά από τραυματισμό του τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνονται, και έτσι έγινε η υπόθεση ότι λειτουργεί σαν σήμα για την προσέλκυση λευκών αιμοσφαιρίων στο σημείο του τραύματος και την εκκίνηση της διαδικασίας επούλωσης (Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 2009)

1.1.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O_2), με το υπεροξειδίο (O_2^-), 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).

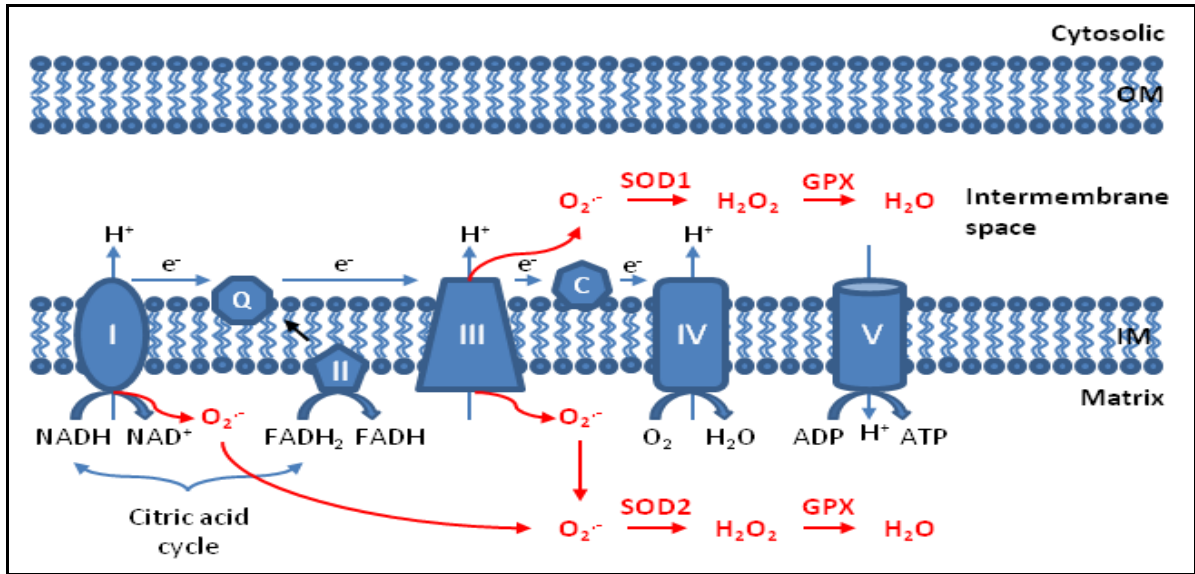
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}\cdot$)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$)	Κατιόν Νιτροσουλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσουλίου (NO^-)

Πίνακας 2: Δραστικές Μορφές Αζώτου.

1.1.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

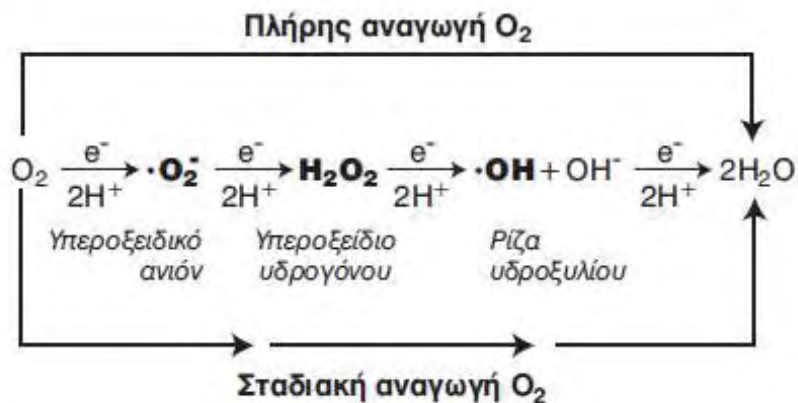
Όπως είναι ευρέως γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Αρχικά, το οξυγόνο που εισέρχεται στον οργανισμό με την αναπνοή, μεταφέρεται μέσω του αίματος στα κύτταρα. Το 95% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται υπό τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξείδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια παράγονται διάφορα προϊόντα, ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο. Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελευθέρων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες:

A) Η πιο σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγής κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου.



Εικόνα 3. Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

β) Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\bullet -}$, το H_2O_2 και το OH^{\bullet} . (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 4. Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

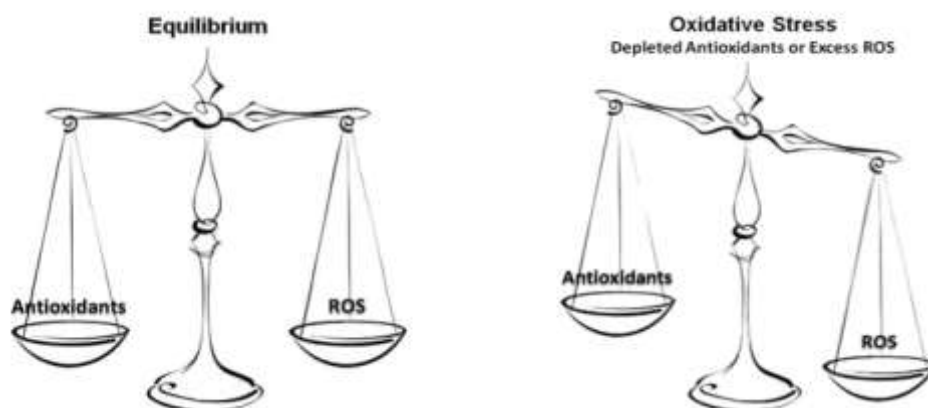
δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Μερικοί από τους εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξειδίο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.2 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση

προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. 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, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 5. Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Ως **αντιοξειδωτική ουσία** ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002). Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους.

- α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
- β) 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.

γ) Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).

δ) Δρουν συνεργειακά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

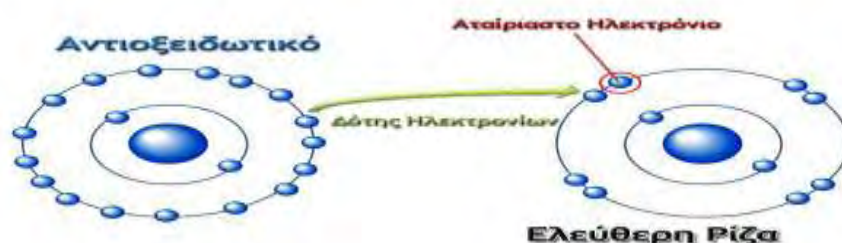
Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σε 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. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, 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 (Gerogianni & Gourgoulialis 2006).

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

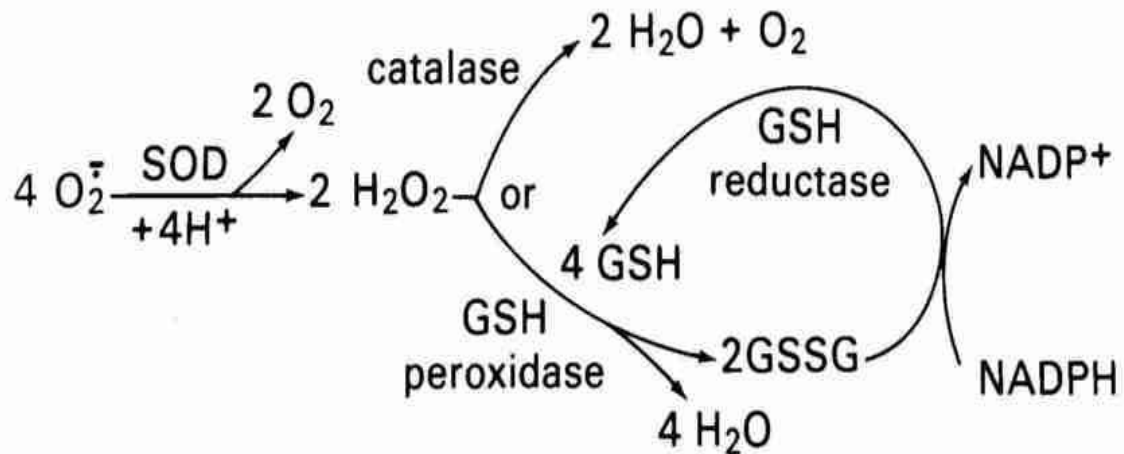
Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Gerogianni&Gourgoulialis 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε

συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH , O^{2-} και NO . Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράγει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak 2011b).



Εικόνα 6. Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) μετατρέπει το O_2^{\cdot} σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση (catalase) με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH peroxidase) μειώνει την λιπιδική υπεροξείδωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δυο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GSH reductase) καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η 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. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko et al. 2006).



Εικόνα 7. Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργική δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η 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. Η 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.

1.3 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-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. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop 2015).



Molecular Hydrogen Institute

Εικόνα 8. Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

Αρκετές 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 et al. 1993), πυρετός (Kataria A.K. 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu & Eriksson 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton, Marlin, Smith, Pat A Harris, et al. 2004), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss et al. 2004), πανώλη (Peste des petits ruminants) (PPR) (Kataria A.K. 2012α), πνευμονία (Wessely-Szponder et al. 2004) και μολύνσεις από παράσιτα προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες (Celi 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, Marlin, Smith, Patricia A Harris, et al. 2004)

1.4 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις πολυάριθμες αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωοκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών (Celi 2010).

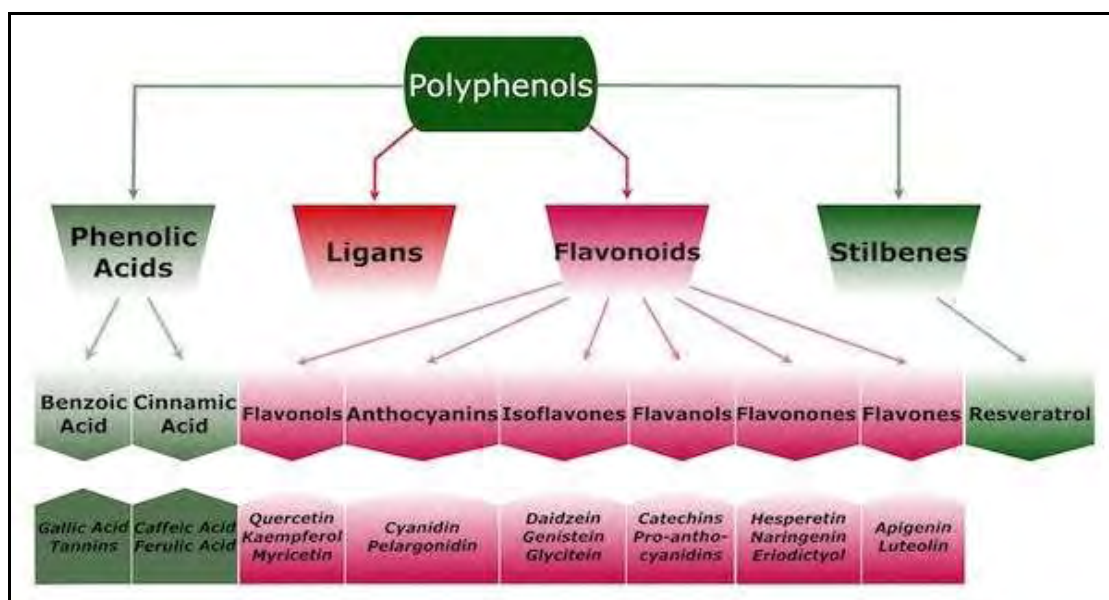
1.5 Πολυφαινόλες

1.5.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών

Το όνομα τους προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «πολύς» και από τη λέξη φαινόλη η οποία αναφέρεται στη χημική δομή που σχηματίζεται με την προσάρτηση σε έναν αρωματικό βενζολικό δακτύλιο μιας υδροξυλικής ομάδας (-OH) παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε στις αλκοόλες. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού, λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων καθώς και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et. al., 2004, Crozier et. al., 2006).

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

Φλαβονοειδή. Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: α) Φλαβονόλες β) Φλαβανόλες γ) Φλαβόνες δ) Φλαβανόνες ε) Ισοφλαβόνες στ) Ανθοκυανιδίνες.



Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών.

- **Μη Φλαβονοειδή**

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε 3 υποκατηγορίες:

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

1.5.2. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

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

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

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

Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από βαρύ φορτίο ρύπων, με κύριο ρυπαντή τις πολυφαινόλες (Mebirouk M., et. al., 2007; Tsimidouet. al. 1992; Ntougias et. al, 2013). Η ύπαρξη διάφορων πολυφαινολών ευθύνεται για το έντονο σκούρο χρώμα και τη χαρακτηριστική μυρωδιά των Υ.Α.Ε. Ουσιαστικά, πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κασιγάρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του.

Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει ευτροφικά φαινόμενα σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους, λίμνες κ.τ.λ).

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, χαρακτηρίζονται από:

- 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 υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, ανήκουν στα Γεωργικά απόβλητα, που το εύρος των τιμών τους, επηρεάζεται από παράγοντες όπως:

- Κλιματολογικές συνθήκες.
- Ποικιλία ελιών.
- Ηλικία ωρίμανσης των καρπών.

- Χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων.
- Τύπος εδάφους.
- Τύπος τεχνολογίας παραγωγής.
- Χρόνος συγκομιδής και αποθήκευσης, πριν την επεξεργασία.

Παράμετρος	Vlyssides et al., 1996		Di Giovacchino & Mascolo, 1988	
	Πίεσης	3-φασικό	Πίεση	3-φασικό
Ολικά στερεά, g/l	99,7	63,5	129,7	61,1
Ολικά αιωρούμενα στερεά, g/l	4,51	2,80		
Ολικά πηκτικά στερεά, g/l	87,2	57,4		
Στάχτη, g/l	9,69	6,13	20	6,4
Ολικός οργανικός άνθρακας, g/l	64,1	39,8		
Ολικό άζωτο Kjeldahl, g/l	1,15	0,76		
Φώσφορος (P ₂ O ₅), g/l	0,87	0,53		
pH	4,50	4,80	5,27	5,23
BOD ₅ , mg/l	68.700	45.500		
COD, mg/l	158.000	92.500	146.000	85.700
Ειδικό βάρος, g/cm ³	1,05	1,05	1,049	1,020
Αγωγιμότητα, mmhos/cm	18,0	12,0		
Ολικά σάκχαρα, g/l	25,9	16,1	35,8	15,9
Λίπη και έλαια, g/l	2,80	1,64	2,26	5,78
Πολυαλκοόλες, g/l	4,75	3,19		
Ολικές φαινόλες, g/l	17,2	10,6	6,2	2,7
Ταννίνες, g/l	6,74	4,01		
Κάλιο (K ₂ O), g/l	3,77	2,37	2,98	1,14
Νάτριο (Na ₂ O), mg/l	406	243	148	48,5
Ασβέστιο (CaO), mg/l	382	271	227	96,6
Σίδηρος (FeO), mg/l	48,3	32,0	42,3	18,0
Μαγνήσιο (MgO), mg/l	74,0	50,0	322	149
Πυρίτιο (SiO ₂), mg/l	28,6	18,0		
Ολικό θείο, mg/l	101	63,0		
Χλώριο, mg/l	219	124		
Mn, mg/l	18,2	12,0	5,32	1,55
Zn, mg/l	19,7	12,0	3,57	2,06
Cu, mg/l	10,50	6,00	3,12	1,59

Πίνακας 3. Σύσταση των Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων.

Όταν απομονώνονται οι πολυφαινόλες από το φορτίο των Υ.Α.Ε., δημιουργείται ένα προϊόν, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές γεωργικές εφαρμογές, όπως η υδρολίπανση και η ενσίρωση. (Gkoutosididis et.al., 2011; Ntougias et. al, 2013), ενώ το πολυφαινολικό προϊόν μπορεί να εκμεταλλευτεί αναλόγως λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών του επιδράσεων.

Φαινολικά Συστατικά	Εύρος Τιμών (mg/L)
tyrosol	5 - 100
hydroxytyrosol	35 - 130
Caffeic acid	4 - 12
Elenolic acid	17 - 1430
luteolin	2 - 623
Cinnamic acid	1 - 118

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις Φαινολικών Συστατικών του Κατσίγαρου. (Lesage et.al.,2001).

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. σε μορφή σκόνης, προστίθενται στην τροφοδοσία νερού των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής νεαρής ηλικίας, με σκοπό την ανάλυση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

1.6 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσθήκη σκόνης πολυφαινολικών πρόσθετων στο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε ιστούς στομάχου και σπλήνας, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος

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



Εικόνα 11. Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.

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

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

Περιγραφή προϊόντος

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

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

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

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

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

Χημική σύσταση

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

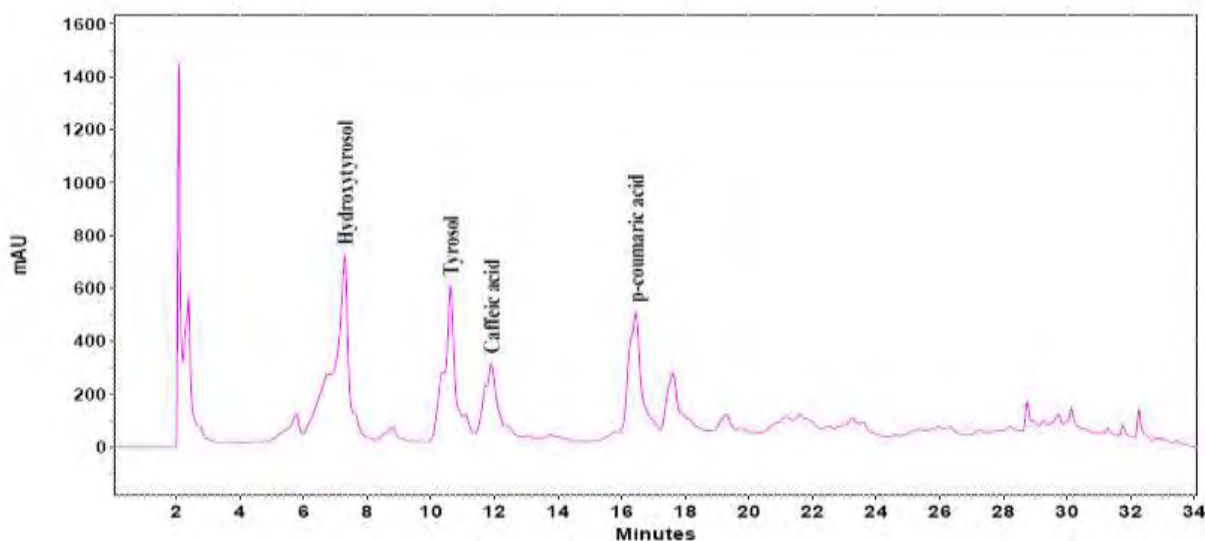
A) Υδροξυτυροσόλη

B) Τυροσόλη

Γ) Καφεϊκό οξύ

Δ) ρ-κουμαρικό οξύ

E) Ανθοκυάνες και κατεχίνες



Εικόνα 12. Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ – ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο 75 κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, υβρίδια F1 SASSO / HUBBARD από την εκτροφή του αγροκτήματος του ΤΕΙ / Θεσσαλίας. Αυτά χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 25 ατόμων ως εξής:

Ομάδα	Συγκέντρωση πολυφαινολικής σκόνης	Ποσότητα πολυφαινολικής σκόνης / 10 L H ₂ O
1η	Control	-
2η	20 µg/ml	2gr
3η	50 µg/ml	5gr

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις πολυφαινολικής σκόνης στις ομάδες των κοτόπουλων.

2.3 Περιγραφή Σιτηρεσίου - Βάρη

Και οι τρεις (3) ομάδες ελάμβαναν κοινό σιτηρέσιο καθώς και νερό που ανανεωνόταν καθημερινά.

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

Πίνακας 6. Σύσταση σιτηρεσίου. *Μορφή: αλευρώδης

Τα κοτόπουλα και των τριών (3) ομάδων ζυγίζονταν κάθε πέντε (5) μέρες, ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί η καμπύλη αύξησης βάρους, καθώς και η απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή των κοτόπουλων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζυγίσεων. Κάθε τιμή είναι αθροιστικά το βάρος και των 25 κοτόπουλων που ανήκουν στην αντίστοιχη ομάδα.

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

Πίνακας 7. Μετρήσεις βάρους κοτόπουλων.

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

Απόδοση σε κρέας %		
CONTROL	20 µg/ml	50 µg/ml
80,3	85,8	86,5

Πίνακας 8. Απόδοση σε κρέας μετά τη σφαγή

2.4 Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση

2.4.1 Ιστοληψία και μεταφορά στο εργαστήριο

Με το πέρας των 60 ημερών, όπου τα κοτόπουλα ελάμβαναν πολυφαινολικό σιτηρέσιο για 45 μέρες, οδηγήθηκαν στο πτηνοσφαγείο. Μετά την θανάτωση τους, αποπτιλώθηκαν, ανοίχθηκαν και με κοινό χειρουργικό νυστέρι πραγματοποιήθηκε η λήψη των ιστών. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασετίνες και ύστερα σε υγρό άζωτο. Έτσι μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -80 °C.

2.4.2 Ομογενοποίηση

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

2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στους Ιστούς

Γενικά

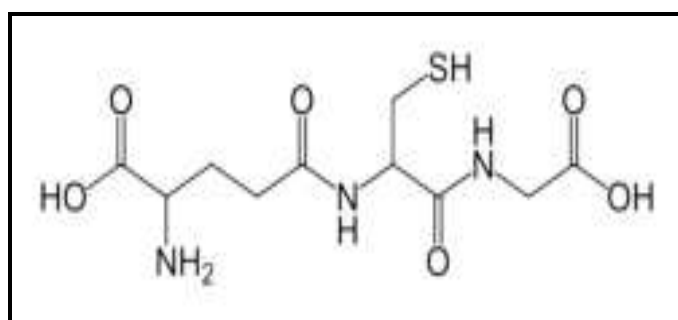
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ομογενοποιημένου ιστού. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, προσδιορίστηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων (είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ), ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Μέθοδοι

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

2.5.1 Μέτρηση Γλουταθειόνης

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

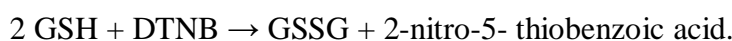


Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

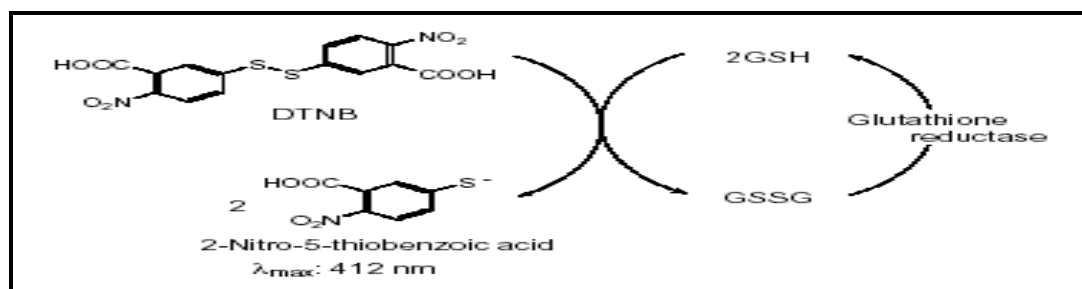
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.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

Αρχή της μεθόδου

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



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



Εικόνα 14. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.
Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 8). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 MI 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 ή HCl, 1 N για pH = 8.

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. ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδροτρινάτριο, tri-sodiumdihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

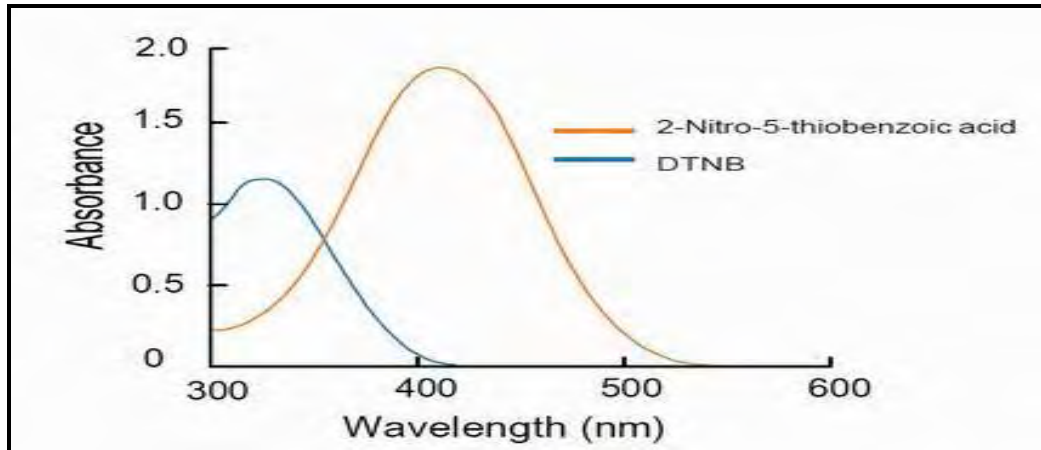
100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8) και 330μL DTNB.

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

Πίνακας 9. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH

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



Εικόνα 15. Φάσμα απορρόφησης του 2-Nitro-5-thiobenzoic οξέος. (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total prot.) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta_{\text{αβστυφλού}}/13.6) \times 2 \times 3$ (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 ομογενοποιημένου ιστού (20 μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 (αραίωση που έγινε από το TCA 5%) και πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, 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.

2.5.2 Μέτρηση ρυθμού διάσπασης H₂O₂

Αρχή της μεθόδου

Η αποσύνθεση του H₂O₂ σε H₂O και O₂ οφείλεται σε ένζυμα όπως: η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι υπεροξειδιοξίνες (Halliwell et al., 2000).

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού διάσπασης του H₂O₂ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του (Aebi et al., 1984).

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH₂PO₄): 136 και **MB (Na₂HPO₄):** 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4,77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7,4.

30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

Πίνακας 10. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση του ρυθμού διάσπασης H₂O₂.

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

ρυθμός διάσπασης $\text{H}_2\text{O}_2 = (\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{permin} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \times 3) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

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

2.5.3 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

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

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

Αρχή της μεθόδου

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

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4). MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ 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 (10 mM) και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι. 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.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

Πίνακας 11. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια ($1000 \mu\text{L}$ στην κυψελίδα / $40 \mu\text{L}$ ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

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

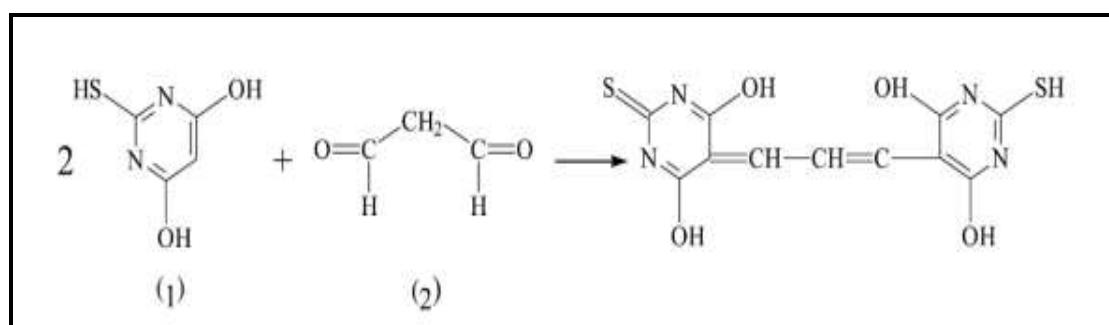
ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

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

2.5.4 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 υπεροξειδωσίας των λιπιδίων.



Εικόνα 16. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

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

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7,4). MB (Tris): 121,14. MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε \approx 100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0,61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0,42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7,4.

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

Διάλυμα Na_2SO_4 (2 M) – TBA (55 mM). MB (TBA): 144,1 και MB (Na_2SO_4): 142,04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2,84 g Na_2SO_4 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 αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

TCA 70%: Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο 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 αποσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95°C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{TBARS (}\mu\text{mol/L)} = (\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0,156 \times 31,$$

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

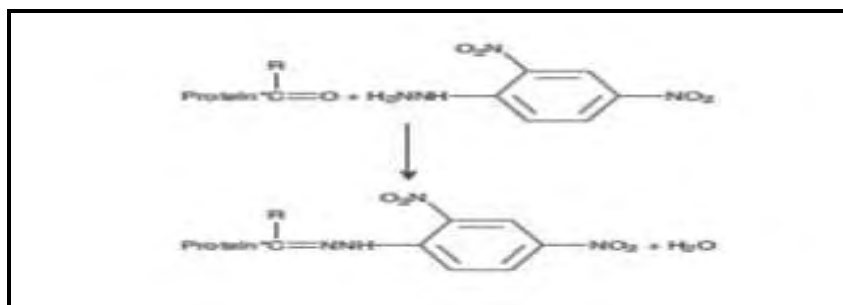
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L .

2.5.5 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 $-\text{C} = \text{O}$, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της αργινίνης (Arg), της λυσίνης (Lys) και της θρεονίνης (Thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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



Εικόνα 17. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

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

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 2.5 N. HCl: MB 36,46; stock 37% (10,1 N)

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

DNPH 14 mM. (MB: 198,1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0,2833 g DNPH σε 100 mL 2,5 NHCl. 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 αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

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

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

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

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

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

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

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων
(nmol/mg total prot.) = Αδείματος- Ατυφλού/0.022 × 1000/50 × 3 × 2x 3/Συγκ.
πρωτεΐνης (mg/mL).

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM × cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη

μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά και μετά ξανά με 3 λόγω της αραίωσης στην αρχή της μεθόδου.

2.5.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

2.6 Στατιστική ανάλυση

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

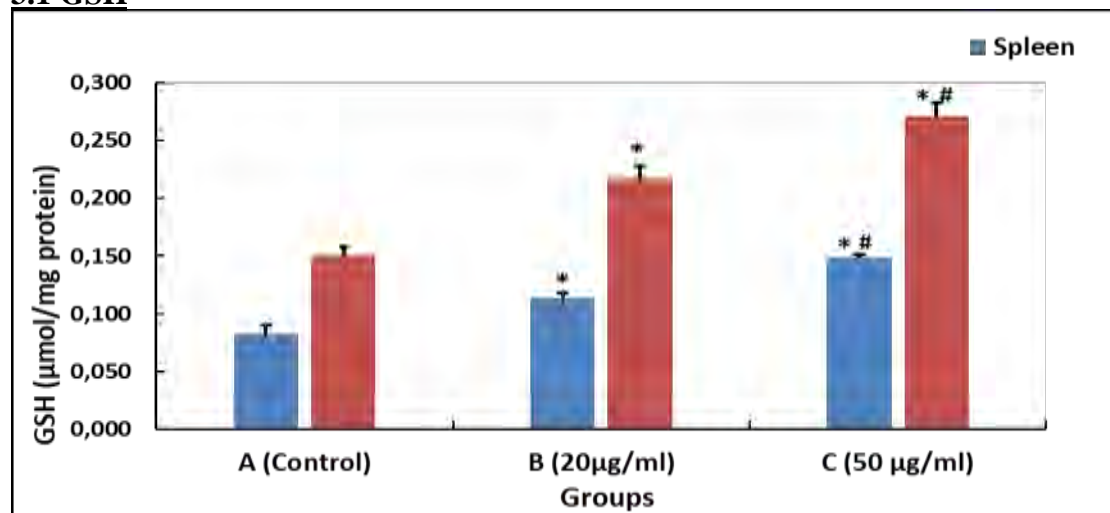
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω των τεστ των Tukey και Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν:

- Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC.
- Η μεταβολή της δραστηριότητας της CAT.
- Η μεταβολή της συγκέντρωσης της GSH.
- Η μεταβολή του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS.
- Η μεταβολή του δείκτη πρωτεϊνικής οξειδωσης CARBONYLS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 GSH



Γράφημα 1. GSH στον Σπλήνα και Στομαχικό ιστό των Κοτόπουλων. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control # $p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετρήσεων της GSH (μmol/mg protein)

GSH ΣΠΛΗΝΑΣ			GSH ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	0,083	0,006	A	0,150	0,008
B (20 μg/ml)	0,113	0,005	B	0,217	0,011
C (50 μg/ml)	0,148	0,003	C	0,271	0,012

Σπλήνας 45 d. treatment	
B	36,14
C	78,31

Πίνακας 13. Αύξηση % σε σχέση με Control.

Στομαχικός 45 d. treatment	
B	44,67
C	80,67

Πίνακας 14. Αύξηση % σε σχέση με Control.

Σπλήνας 45 d. treatment	
C	30,97

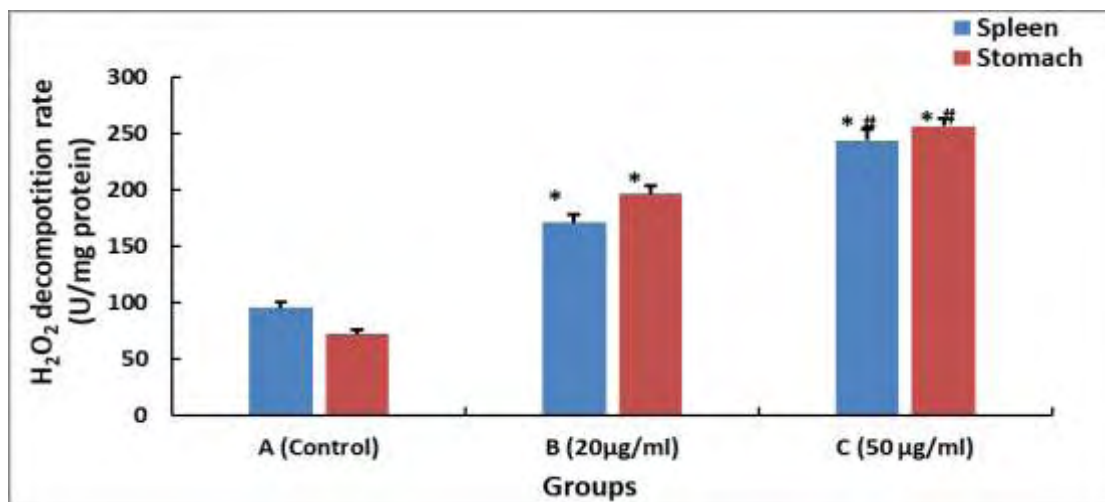
Πίνακας 15. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Στομαχικός 45 d. treatment	
C	24,88

Πίνακας 16. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Όπως παρατηρούμε και στον σπλήνα, αλλά και στον στομαχικό ιστό υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης στα κοτόπουλα που κατανάλωσαν τις πολυφαινόλες.

3.2 Ρυθμός Διάσπασης H₂O₂



Γράφημα 2. Ρυθμός Διάσπασης H₂O₂ στον Σπλήνα και Στομαχικό ιστό των Κοτόπουλων.

* p < 0,05 σε σύγκριση με το Control

p < 0,05 μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΣΠΛΗΝΑ			ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	95,6	5,01	A	72,2	4,08
B (20µg/ml)	171,3	7,03	B	197,0	7,22
C (50 µg/ml)	244,2	9,85	C	257,2	6,65

Πίνακας 17. Αποτελέσματα μετρήσεων του Ρυθμού Διάσπασης H₂O₂ (U/mg protein).

	Σπλήνας 45 d. treatment
B	79,18
C	155,4

Πίνακας 18. Αύξηση % σε σχέση με Control.

	Στομαχικός 45 d. treatment
B	172,9
C	256,2

Πίνακας 19. Αύξηση % σε σχέση με Control.

	Σπλήνας 45 d. treatment
C	42,56

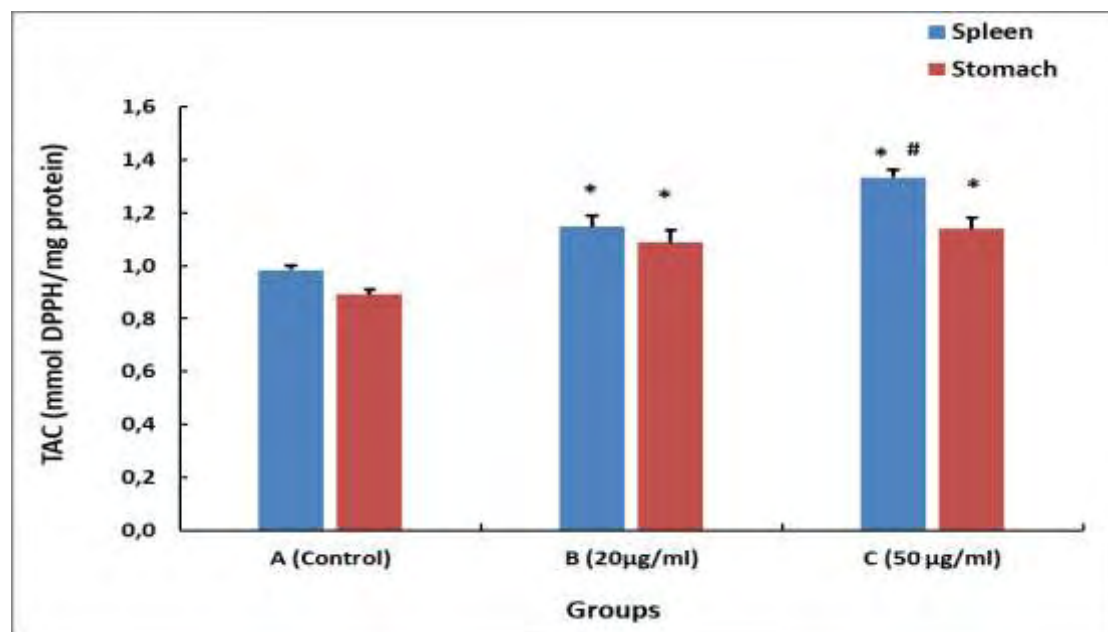
Πίνακας 20. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

	Στόμαχος 45 d. treatment
C	30,56

Πίνακας 21. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Όπως παρατηρούμε και στον σπλήνα, αλλά και στον στομαχικό ιστό υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του ρυθμού διάσπασης του H₂O₂ στα κοτόπουλα που κατανάλωσαν τις πολυφαινόλες.

3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)



Γράφημα 3. TAC στον Σπλήνα και Στομαχικό ιστό των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΣΠΛΗΝΑΣ			ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	0,984	0,017	A	0,892	0,019
B (20 µg/ml)	1,147	0,041	B	1,087	0,046
C (50 µg/ml)	1,333	0,029	C	1,138	0,044

Πίνακας 22. Αποτελέσματα μετρήσεων της TAC (mmol DPPH/mg protein).

	Σπλήνας 45 d. treatment
B	16,57
C	35,47

Πίνακας 23. Αύξηση % σε σχέση με το Control

	Στομαχικός 45 d. treatment
B	21,86
C	27,58

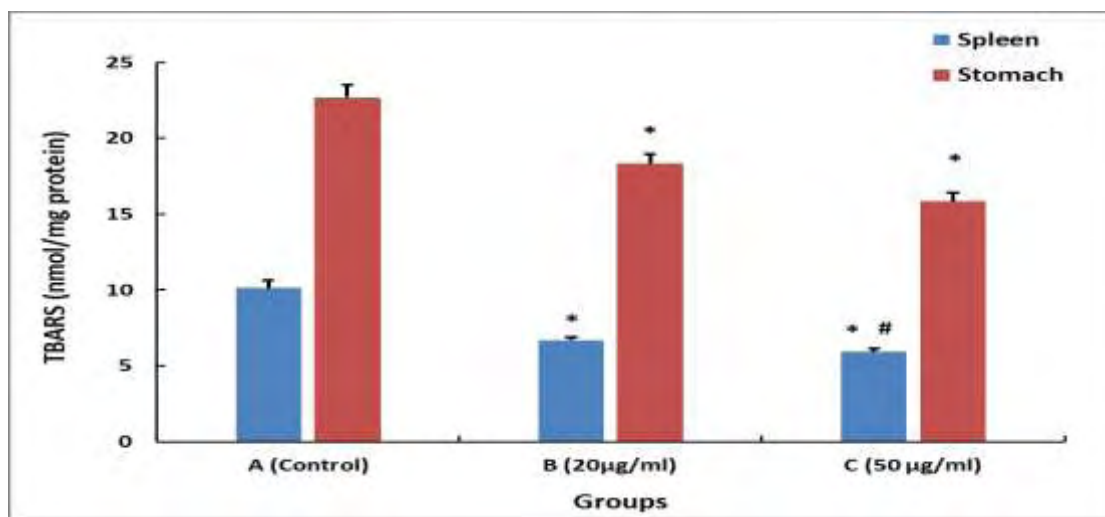
Πίνακας 24. Αύξηση % σε σχέση με Control.

	Σπλήνας 45 d. treatment
C	16,22

Πίνακας 25. Αύξηση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Όπως παρατηρούμε και στον σπλήνα, αλλά και στον στομαχικό ιστό υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα κοτόπουλα που κατανάλωσαν τις πολυφαινόλες..

3.4 TBARS



Γράφημα 4. TBARS στον Σπλήνα και Στομαχικό ιστό των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

TBARS ΣΠΛΗΝΑΣ			TBARS ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	10,143	0,493	A	22,688	0,803
B (20µg/ml)	6,693	0,210	B	18,325	0,609
C (50 µg/ml)	5,919	0,200	C	15,854	0,529

Πίνακας 26. Αποτελέσματα μετρήσεων των TBARS (nmol /mg protein).

	Σπλήνας 45 d. treatment
B	34,01
C	41,64

Πίνακας 27. Μείωση %
σε σχέση με Control.

	Στομαχικός 45 d. treatment
B	19,23
C	30,12

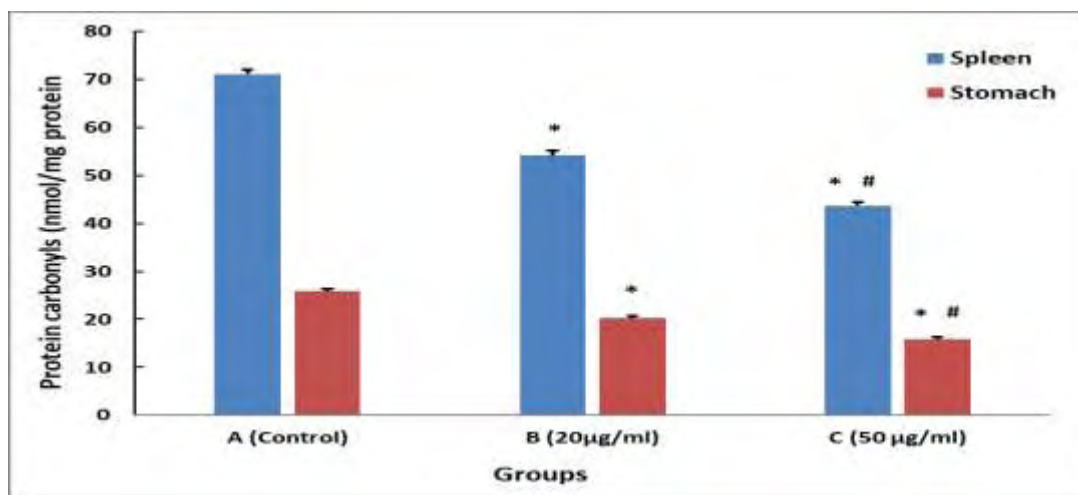
Πίνακας 28. Μείωση %
σε σχέση με Control.

	Σπλήνας 45 d. treatment
C	11,56

Πίνακας 29. Μείωση %
της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Όπως παρατηρούμε και στον σπλήνα, αλλά και στον στομαχικό ιστό υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS στα κοτόπουλα που κατανάλωσαν τις πολυφαινόλες..

3.5 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια



Γράφημα 5. Καρβονύλια στον Σπλήνα και Στομαχικό ιστό των Κοτόπουλων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control

$p < 0,05$ μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων

ΣΠΛΗΝΑΣ			ΣΤΟΜΑΧΟΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
A (Control)	71,13	0,934	A	25,83	0,545
B (20µg/ml)	54,18	0,927	B	20,23	0,475
C (50 µg/ml)	43,72	0,793	C	15,84	0,402

Πίνακας 30. Αποτελέσματα μετρήσεων των Carb. (nmol /mg protein).

Σπλήνας 45 d. treatment	
B	23,83
C	38,53

Πίνακας 31. Μείωση % σε σχέση με Control.

Στομαχικός 45 d. treatment	
B	21,68
C	38,68

Πίνακας 32. Μείωση % σε σχέση με Control

Σπλήνας 45 d. treatment	
C	19,31

Πίνακας 33. Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Στομαχικός 45 d. treatment	
C	21,70

Πίνακας 34. Μείωση % της ομάδας C, σε σχέση με B ομάδα.

Όπως παρατηρούμε και στον σπλήνα, αλλά και στον στομαχικό ιστό υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση στα πρωτεϊνικά καρβονύλια στα κοτόπουλα που κατανάλωσαν τις πολυφαινόλες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής ύστερα από προσθήκη στο νερό τους πολυφαινολικής σκόνης, που παράγεται από νανοενθυλάκωση με χρήση μαλτοδεξτρίνης, από το υγρό (υδατικό κλάσμα) που προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: μία ομάδα control και δύο που λάμβαναν τη σκόνη πολυφαινόλης σε συγκεντρώσεις 20 και 50 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Το σιτηρέσιο ήταν το ίδιο για όλες τις ομάδες. Συνολικά πραγματοποιήθηκε ιστοληψία από τριάντα έξι (36) κοτόπουλα, δηλαδή από δώδεκα (12) κοτόπουλα σε κάθε μία από τις τρεις (3) ομάδες.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός διάσπασης του H_2O_2 , η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC - total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Εξήχθησαν λοιπόν συμπεράσματα σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των ιστών στομάχου και σπλήνας των κοτόπουλων, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των πτηνών της ομάδας ελέγχου (κοτόπουλα που δεν λάμβαναν την πολυφαινολική σκόνη) και των πολυφαινολικών ομάδων (κοτόπουλα που λάμβαναν πολυφαινολική σκόνη) είτε μεταξύ των πτηνών των πολυφαινολικών ομάδων.

Αξίζει να αναφερθεί πως το πεπτικό σύστημα των κοτόπουλων είναι πολύ απλό αλλά αποτελεσματικό σε σύγκριση με πολλά άλλα είδη, όπως τα βοοειδή. Είναι απαραίτητο η διατροφή που παρέχεται στα πτηνά να είναι υψηλής ποιότητας και εύπεπτη λόγω της απλότητας στη δομή και λειτουργία του πεπτικού συστήματος. (*University of New England, Australia*). Στο στομάχι των κοτόπουλων υπάρχουν πολυάριθμοι αδένες που παράγουν έναν αριθμό ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην πέψη ή στη διάσπαση των τροφίμων στα συστατικά τους θρεπτικά συστατικά. Η βλεννογόνος μεμβράνη ανυψώνεται σε πτυχές και μεταξύ αυτών των πτυχών υπάρχουν πολυάριθμοι απλοί σωληνοειδείς αδένες που παράγουν υδροχλωρικό οξύ καθώς και λεμφικό ιστό. Στο πάγκρεας των κοτόπουλων εκτελείται η παραγωγή υγρών που είναι ένα μείγμα πεπτικών ενζύμων, καθώς επίσης και η έκκριση των

ορμονών ινσουλίνη και γλυκαγόνη που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που εξετάστηκαν, αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του στους έμβιους οργανισμούς. 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 μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholzetal., 1964) (Hughesetal., 1989), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementietal., 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. Σημαντική 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 (GST) στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυμικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης, παρατηρείται ότι και στο στομαχικό ιστό και στη σπλήνα, η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό των πτηνών έχει αυξήσει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της σε σχέση με την ομάδα control. Συγκεκριμένα σε σύγκριση με το control, στον στομαχικό ιστό τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν κατά 44,7% στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 80,7%. Στον σπλήνα σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν κατά 36,1% στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 78,3%. Αυτό υποδηλώνει ότι ίσως οι φαινολικές ενώσεις της σκόνης, επιδρούν στη αύξηση των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH. Αυτά τα ένζυμα είναι η λιγάση της γ -γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και η GSH συνθετάση (Aquilanoetal. 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται μέσω του στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumaretal. 2014). Σε παρόμοιες εργασίες που έχουν διεξαχθεί σε κοτόπουλα

κρεατοπαραγωγής, η χορήγηση πολυφαινολών από απόβλητα ελαιοτριβείου στην τροφή τους, είχε ως αποτέλεσμα, η GSH να παρουσιάσει αύξηση στο αίμα των πτηνών (Gerasopoulos et.al. 2015).

Όσον αφορά τον ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 σε H_2O και O_2 οφείλεται εκτός της καταλάσης (Halliwell et al., 2000) και σε ένζυμα όπως: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και οι υπεροξειδιοξίνες. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 , είναι σημαντικά υψηλός και στους δύο ιστούς (στόμαχο και σπλήνα), τα οποία είναι ζωτικά όργανα του συστήματος της πέψης, που διασπούν τα τοξικά υπεροξειδία του υδρογόνου, παράγοντας νερό και οξυγόνο. Από την αξιολόγηση των μετρήσεων για την διάσπαση του H_2O_2 προκύπτουν τα εξής. Παρατηρείται ότι στον στομαχικό ιστό και στη σπλήνα, η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό έχει αυξήσει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της σε σχέση με την ομάδα control, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση υπάρχει και μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με το control, στον στομαχικό ιστό τα επίπεδα της διάσπασης υπεροξειδίου αυξήθηκαν κατά 172,9 % στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 256,2 %. Στον σπλήνα, σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα της διάσπασης αυξήθηκαν κατά 79,2 % στην ομάδα των 20 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στην ομάδα των 50 $\mu\text{g/ml}$ αυξήθηκαν κατά 155,4 %. Η αύξηση της διάσπασης μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων κυμάνθηκε στο 30,6 % υπέρ της ομάδας των 50 $\mu\text{g/ml}$ στον στόμαχο και το ίδιο κατά 42,6% στον σπλήνα. Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πως τα ΥΑΕ, αυξάνουν την διάσπαση του H_2O_2 και άρα και την δραστηριότητα της καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και στους νεφρούς αρουραίων (Hamden et al., 2009).

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), αυτή αναφέρεται στα αναγωγικά στοιχεία και στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Όπως είναι γνωστό, κάθε συστατικό έχει διαφορετική 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. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity) στα κοτόπουλα δείχνουν πως, από την σύγκριση των ομάδων control με τις πολυφαινολικές ομάδες, ο συγκεκριμένος δείκτης και στους δύο ιστούς εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με το control, στον

στομαχικό ιστό τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 21,9 % στην ομάδα των 20 µg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 µg/ml αυξήθηκαν κατά 27,6 %. Στη σπλήνα σε σύγκριση με το control, τα επίπεδα TAC αυξήθηκαν κατά 16,6 % στην ομάδα των 20 µg/ml, ενώ στην ομάδα των 50 µg/ml αυξήθηκαν κατά 35,5 %. Η αύξηση της TAC στους δύο ιστούς είναι σε συμφωνία με την αύξηση της GSH σε αυτούς. Δηλαδή, φαίνεται ότι στην αύξηση αυτού του σημαντικού αντιοξειδωτικού μορίου οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων ιστών.

Η υπεροξείδωση των 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 υπεροξείδωσης. Συγκεκριμένα, από τη σύγκριση της ομάδας control με τις ομάδες των κοτόπουλων που έλαβαν πολυφαινολική σκόνη στο νερό τους, προκύπτει στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS και στους δύο ιστούς, αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση τους στον σπλήνα, μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων. Σε σύγκριση με τα control στον στομαχικό ιστό τα οξειδωμένα λιπίδια μειώθηκαν κατά 19,2 % στην ομάδα των 20 µg/ml και 30,1% στην ομάδα των 50 µg/ml. Στον σπλήνα οι αντίστοιχες μειώσεις ήταν 34,0 % και 41,6%. Η μείωση των TBARS μεταξύ των πολυφαινολικών ομάδων στον σπλήνα, κυμάνθηκε στο 11,6% υπέρ της ομάδας των 50 µg/ml. Η μείωση των TBARS στους προαναφερθέντες ιστούς ίσως οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα της GSH η οποία παρείχε προστασία στους συγκεκριμένους ιστούς από την οξείδωση των λιπιδίων. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) μέσω της τροφής σε χοιρίδια, επίσης μειώθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos et al. 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα ΥΑΕ. Η μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος, καθώς η οξείδωση των λιπιδίων στο κρέας είναι μία από τις κύριες αιτίες για τον περιορισμό της ποιότητας του (Arshad et al., 2013). Ειδικότερα, η οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Nama and Ahn, 2003). Άλλες μελέτες έχουν δείξει

ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα απόβλητα των ελαιοτριβείων (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και καφεϊκό οξύ) είναι αποτελεσματικές στο να αναστείλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (*Cardinali et al., 2012; Rubio-Senent et al., 2015*).

Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους δυο ιστούς, έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των καρβονυλίων τόσο ανάμεσα στις πολυφαινολικές ομάδες με την ομάδα control, όσο και στις πολυφαινολικές ομάδες μεταξύ τους. Στον στομαχικό ιστό η μείωση της ομάδας των 20μg/ml σε σχέση με την ομάδα control ήταν 21,7 %, ενώ σε αυτή των 50μg/ml ήταν 38,7 %. Στον σπλήνα αντίστοιχα οι τιμές ήταν 23,8 % και 38,5%. Δηλαδή και στους δύο ιστούς παρατηρούμε ότι η επίδραση της σκόνης είναι ευεργετική καθώς μειώνεται η οξειδωση των πρωτεϊνών. Επίσης, φαίνεται πως η ομάδα των 50 μg/ml παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα των 20 μg/ml και στους δύο ιστούς. Συγκεκριμένα, στον στομαχικό ιστό είχαμε μείωση κατά 21,7% και στη σπλήνα κατά 19,3% στα 50 μg/ml σε σύγκριση με τα 20 μg/ml. Σε παρόμοια μελέτη, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) μέσω της τροφής σε χοιρίδια αλλά και σε κοτόπουλα, επίσης μειώθηκε η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών σε όλους τους ιστούς και στο αίμα αντίστοιχα (*Gerasopoulos et al. 2015*), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE. Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων 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 ενός μεγάλου φάσματος αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδειχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Γενικώς, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της θρεπτικής τους αξίας (*Villaverdeetal., 2014; Lundetal., 2011*). Η μείωση των επιπέδων τόσο των TBARS όσο και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους εξεταζόμενους ιστούς στα κοτόπουλα που έγινε η

χορήγηση των πολυφαινολικών πρόσθετων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αύξηση της TAC σε αυτούς τους ιστούς. Και πιο συγκεκριμένα η μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην αύξηση της GSH αλλά και της δράσης των ενζύμων που αποικοδομούν το H₂O₂ όπως έδειξαν τα αποτελέσματά μας.

Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο νερό κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής βελτιώνει σημαντικά την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών που ελέγχθηκαν. Αυτή η ευεργετική επίδραση της σκόνης από YAE, βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (υδροξυτυροσόλη, κατεχίνη, επικατεχίνη, ουριδίνη, γενιστεΐνη, γενιστίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, π-μεθόξυκουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ). Ως λογικό επακόλουθο, ενισχύεται η αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στα παραγωγικά ζώα και γενικότερα η ευζωία τους. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των ζώων εκτροφής, θεωρείται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (*Lykkesfeldt and Svendsen, 2007*). Έτσι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, δείχνουν για την πρώτη φορά ότι η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης στο πόσιμο νερό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής, με τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλαδή οξείδωση πρωτεϊνών, υπεροξειδωση λιπιδίων) και την αύξηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. ένζυμα που αποικοδομούν το H₂O₂, GSH, TAC).

Με βάση τα αποτελέσματα, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί η εξεταζόμενη πολυφαινολική σκόνη ως συμπλήρωμα σε άλλες τροφές ζώων ή ακόμη και σε ανθρώπινα τρόφιμα, σε συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Επίσης, η χρήση της πολυφαινολικής σκόνης και ιδιαίτερα των υποπροϊόντων από την διαδικασία παρασκευής της, που μελετήθηκε στο πρόσφατο παρελθόν (*Gerasopoulos et al., 2015*), θα μπορούσε να είναι μία καλή λύση στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, pp.121–126.
- AICR (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective; World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Washington, DC, USA
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–22.
- Apostolou, A. et al., 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, pp.60–68
- Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.
- Arshad, M.S. et al., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in health and disease*, 12, p.164
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *The Biochemical Journal*, 258(2), 617–20.
- 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), pp.1–23.
- Battin, T.J., Luyssaert, S., Kaplan, L.A., Aufdenkampe, A.K., Richter, A., Tranvik, L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*.
- Bidlack, W.R., Omay, S.T., Meskin, M.S., Topham, D.K.W., 2000. Phytochemicals as bioactive agents. CRC Press
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase. Catalase Structural Tutorial Text
- 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), pp.228–237.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–33.

- Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. *R. Bras. Zootec.* v.39, pp.348-363
- Celi, P., 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(2), pp.233–240
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(2), pp.192–208.
- COOKE, M. S. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), pp.337–353.
- Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(4), pp.459–469.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp.872–879. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., et al., 2015. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, pp.42–49
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Krouezas, A., Karaveli, C., Barda, C., Gkika, H., ... Kouretas, D. (n.d.). Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater In Vivo (*Athens, Greece*), 30(3), 291–301.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., et al., 2015. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, pp.319–327.

- Gerogianni, I., Gourgoulialis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. *Archives of Hellenic Medicine*.23(5), pp.444–454.
- Gkoutsidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. 2011. Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltrationdesalination and water treatment. *Volume 30, Issue 1-3, Pages 237-246*.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*, 18(9), pp.685–716
- Hamden K1, Allouche N, Damak M, Elfeki A, 2009, Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact*. 2009 Aug 14;180(3):421-32. doi: 10.1016/j.cbi.2009.04.002. Epub 2009 Apr 23.
- Han, X., Shen, T. & Lou, H., 2007.Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. , 2, pp.950–988
- Harborne, J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids.*Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
- Hayyan, M., Hashim, M.A. &AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), pp.3029–3085.
- HUGHES, R.E., 1964. REDUCTION OF DEHYDROASORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES.*Nature*, 203, pp.1068–1069
- 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), pp.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), pp.231–236
- Khallouki, F. et al., 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), pp.67–75.
- Khan, N., &Mukhtar, H. (2007).Tea polyphenols for health promotion.*Life Sciences*, 81(7), 519–33.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls.*The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.

- Kris-Etherton, P.M. et al., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113 Suppl 9B, p.71S–88S
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15–21
- Kumar, H. et al., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural product reports*, 31(1), pp.109–139.
- Kushi, L.H. et al., 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), pp.30–67.
- Lander, H. M. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB Journal* vol. 11 no. 2 118-124.
- Lund, M.N. et al., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.83–95
- Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 173(3), pp.502– 511.
- Manach, C. et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M., Gonzalez, J. 2007. The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *phanerochaetae chrysosporium*. *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366-371.
- Mennen, L.I. et al., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.326S–329S
- Meskin, M.S., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Omaye, S.T., 2002. *Phytochemicals in nutrition and health*. CRC Press.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebozinska, E. & Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*, 76(9), pp.2812–2823
- Muller, F.L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp.477–503.
- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo* (Athens, Greece), 13(3), pp.295–309.
- 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.

- Patsoukis, N. et al., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters*, 357(2), pp.83–86.
- Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 18 June 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, *Nature* 459, 996-999
- Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp.55–74
- Poljsak, B., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients.
- Rinnerthaler, M. et al., 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Roland, F.B., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase
- Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), pp.287–306.
- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumprich, E., Reddy, C.C., 1989. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci.* 570, pp.514–7.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 5(3), pp.237–245
- Tristan P. Dew, Andrea J. Day, and, & Morgan*, M. R. A. (2005). Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
- Villaverde, A., Morcuende, D. & Estevez, M., 2014. Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of food science*, 79(7), pp.C1331–42.

Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι .
Δραστικέςρίζεσοξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.