

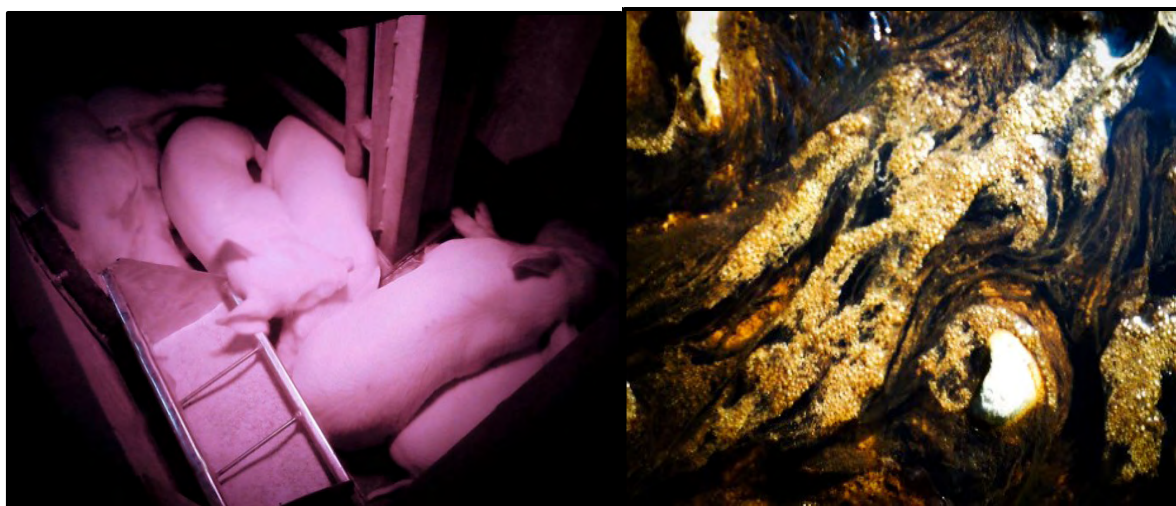


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΟ
ΙΣΤΟ ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGG BLOOD AND
HEPATIC TISSUE IN ABLACTATION PERIOD TREATED WITH
POLYPHENOLIC ADDITIVES**



ΕΛΕΝΗ ΓΚΙΚΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην οικογένεια μου,
που πάντα με προέτρεπε στη γνώση
και μου έδωσε όλα τα εφόδια και τα θεμέλια
να εξελιχθώ και να ολοκληρωθώ
ως άνθρωπος και ως επιστήμονας.

Και στην αγαπημένη μου, Beauty.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, εκπονήθηκε στα εργαστήρια: Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων - Βιοσυστημάτων και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Θεσσαλίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για τη συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό και τον κ. Στυλιανό Κόκκα, Προϊστάμενο του Κτηνοτροφικού Τμήματος του Αγροκτήματος του ΤΕΙ Θεσσαλίας για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τη βοήθεια τους στην άμεση παροχή των κατάλληλων υλικών που χρειάστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, αλλά και το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν κατά την παρουσία μας στις εγκαταστάσεις του Αγροκτήματος του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, αλλά ιδιαίτερα τον Υποψήφιο Διδάκτορα, Κώστα Γερασόπουλο που συνέβαλε τα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, όσο και για την «πατρική» παρουσία του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχει σημαντική αύξηση στην παραγωγή των προϊόντων διατροφής φυτικής προέλευσης. Ο κύριος λόγος είναι το πολυφαινολικό περιεχόμενο τους, στο οποίο αποδίδεται από μελέτες, σημαντική βιολογική δράση.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διατροφή έντεκα (11) χοιριδίων τα οποία προήλθαν από μία (1) χοιρομητέρα, με ζωοτροφές που περιείχαν πολυφαινολικά πρόσθετα, από επεξεργασμένα ΥΑΕ (υγρά αποβλήτα ελαιοτριβείου), προκειμένου να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες στο αίμα τους και στον ηπατικό ιστό, σε νεαρή ηλικία. Για το λόγο αυτό, οι χοίροι χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Η ομάδα Α ήταν η ομάδα ελέγχου, με τη βασική δίαιτα σε όλο το πείραμα. Η άλλη ομάδα ελάμβανε το σιτηρέσιο που περιείχε τα πολυφαινολικά πρόσθετα.

Πέντε (5) συλλογές αίματος από όλα τους χοίρους έγιναν σε δύο (2), δώδεκα (12), τριάντα τρεις (33), σαράντα τέσσερις (44) και σαράντα οχτώ (48) ημέρες από τη γέννησή τους. Τρεις (3) συλλογές ηπατικού ιστού έγιναν σε δύο (2), δώδεκα (12) και σαράντα οχτώ (48) ημέρες από τη γέννησή τους. Μετά από κάθε συλλογή αίματος, άμεσα στο εργαστήριο γινόταν η συλλογή του πλάσματος και του αιμόλυματος (Ramnath et. al., 2007). Το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηριότητας της καταλάσης. Το πλάσμα για τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν στους -80°C , μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ήταν θετικά και ενθαρρυντικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών οξειδωτικού στρες, μεταξύ των ομάδων σε σχέση με το χρόνο, δείχνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, οι δείκτες του οξειδωτικού στρες στην ομάδα που ελάμβανε τα πολυφαινολικά πρόσθετα, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με αυτούς της ομάδας ελέγχου, τόσο στο αίμα, όσο και στον ηπατικό ιστό. Για παράδειγμα, στις σαράντα οχτώ (48) ημέρες μετά τη γέννηση, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στην πολυφαινολική ομάδα παρουσιάζεται κατά 23,3% υψηλότερη αυτής της ομάδας ελέγχου. Το ίδιο ισχύει και στον ηπατικό ιστό με τη συγκέντρωση στην πολυφαινολική ομάδα αυξημένη κατά 32%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρουσιάζεται αύξηση της καταλάσης κατά 25% στο αιμόλυμα και 20% στον ηπατικό ιστό. Η TAC, ενώ στο πλάσμα παρουσιάζεται στατιστικά αυξημένη κατά 17%, στον ηπατικό ιστό δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τέλος, όσον αφορά τα TBARS και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στην πολυφαινολική ομάδα εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές μειώσεις τόσο στο πλάσμα όσο και τον ηπατικό ιστό, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Συνεπώς, η χρήση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ αποδεικνύει την αντιοξειδωτική τους δράση, μετά τη χορήγηση τους σε χοίρους κρεατοπαραγωγής σε νεαρή ηλικία και καθίσταται εφικτή για τη δημιουργία προϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας.

ABSTRACT

For several years, there has been a great interest in the development of plant food products with antioxidant activity. This activity is attributed to a large extent to their polyphenolic content.

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

For this reason, the young pigs were divided into two (2) groups. The group A was the control group, with the basic diet throughout the experiment, while the other group was received special feed with polyphenolic additives.

Five (5) blood collections were performed at two-, twelve- (12), thirty three- (13), forty four- (44) and forty eight- (48) days old pigs. Three (3) liver tissue collections were performed at two- (2), twelve- (12) and forty four- (48) days old pigs.

After each blood and liver tissue collection, biochemical analysis of the samples was performed to collect hemolysate and plasma. The hemolysate was used for assaying reduced glutathione (GSH) and catalase activity, and the plasma was used for the assessment of TBARS, protein carbonyls and total antioxidant capacity (TAC). The liver tissues were homogenized and stored at -80° C, until their biochemical analysis.

Summarizing, the results of this work were positive and encouraging. The polyphenolic additives increased antioxidant status of the young pigs fed with the polyphenolic extracts, in relation to time. Specifically, the biomarkers of oxidative stress in the group receiving the polyphenolic additives show statistically significant differences from those of the control group, both in blood and liver tissue. For example, in the forty-eight (48) days after birth, the concentration of reduced glutathione (GSH) in the polyphenol group was 23,3% higher than the control group. The same results were observed in the liver tissue, where the GSH concentration in polyphenolic group was 32% higher compared to the control group. Moreover, there was a significant increase in catalase activity by 25% in blood samples and by 20% in hepatic tissue of polyphenol group compared to control group. In addition, TAC in plasma of polyphenol group was higher by 17% than the control group, while there was not significant difference between the two groups in hepatic tissue. Finally, as regards the TBARS and protein carbonyls, there were significant decreases in both plasma samples and hepatic tissue of polyphenol group, in contrast to control group.

In conclusion, using polyphenolic additives from processed OMWW as feed in young pigs may be suitable for improving their antioxidant status, and consequently the quality of the produced meat.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Πολυφαινόλες.....	10
1.1.1 Ορισμός.....	10
1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.....	11
1.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.....	11
1.3 Χημειοπροστατευτική δράση πολυφαινολών.....	11
1.3 Οξειδωτικό Στρες.....	14
1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.....	14
1.3.2 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂	15
1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.....	16
1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.....	18
1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.....	19
1.4 Σκοπός.....	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1 Γενικά.....	22
2.2 Περιγραφή σιτηρεσίου.....	24
2.3 Αιμοληψία.....	26
2.4. Επεξεργασία Αίματος.....	27
2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.....	28
2.5.1. Γενικά.....	28
2.5.2. Μέθοδοι.....	28
2.5.2.1 GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	28
2.5.3 Δραστηριότητα της Καταλάσης.....	31
2.5.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	31

2.5.3.2 Αντιδραστήρια.....	32
2.5.3.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.	32
2.5.3.4 Υπολογισμοί.....	32
2.5.3.5 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).	33
2.5.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	33
2.5.4.2 Αντιδραστήρια.....	34
2.5.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο.	34
2.5.4.2 Υπολογισμοί.	35
2.5.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	35
2.5.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	35
2.5.5.2 Αντιδραστήρια.....	36
2.5.5.3 Πειραματικό Πρωτόκολλο.	36
2.5.5.4 Υπολογισμοί.....	37
2.5.6 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	37
2.5.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	37
2.5.6.2 Αντιδραστήρια.....	38
2.5.6.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.	39
2.5.6.4 Υπολογισμοί.....	39
2.6 Ομογενοποίηση Ιστών.....	39
2.6.1. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Ηπατικό Ιστό.	40
2.6.1.1. GSH	40
2.6.1.2. Δραστηριότητα της Καταλάσης.	41
2.6.1.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).....	41
TBARS – Καρβονύλια.	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.

<i>Πίνακας 1: Κυριότερες Πολυφαινόλες Στα ΥΑΕ.</i>	<i>13</i>
<i>Πίνακας 2: Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, Ομάδας Α (ελέγχου).</i>	<i>24</i>
<i>Πίνακας 3: Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας (Β) με Πολυφαινολικά Πρόσθετα.</i>	<i>24</i>
<i>Πίνακας 4: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της GSH.....</i>	<i>30</i>
<i>Πίνακας 5: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της Καταλάσης..</i>	<i>32</i>
<i>Πίνακας 6: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της TAC.</i>	<i>34</i>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.

<i>Εικόνα 1: Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η Απλούστερη Φαινόλη.</i>	<i>11</i>
<i>Εικόνα 2: Βιολογικές Ιδιότητες Των Φαινολικών Συστατικών Του Ελαιολάδου (Cicerale et al., 2008)</i>	<i>12</i>
<i>Εικόνα 3: Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Niaounnakis & Halvadakis, 2006) [συνέχεια στην επόμενη σελίδα].</i>	<i>13</i>
<i>Εικόνα 4: Συνέχεια από: Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Niaounnakis & Halvadakis, 2006).</i>	<i>14</i>
<i>Εικόνα 5: Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.</i>	<i>17</i>
<i>Εικόνα 6: Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.</i>	<i>18</i>
<i>Εικόνα 7: Κλινικές Καταστάσεις Με Τις Οποίες Έχει Βρεθεί Ότι Σχετίζονται Τα ROS (Lee et al., 2003).</i>	<i>19</i>
<i>Εικόνα 8: Οι Χώροι Εγκατάστασης Στις Οποίες Εκτράφηκαν οι Χοίροι Που Συμμετείχαν Στην Παρούσα Μελέτη.</i>	<i>22</i>
<i>Εικόνα 9 Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσκευή Αποσυμπίεσης.</i>	<i>25</i>
<i>Εικόνα 10 Αιμοληψία Από Πρόσθια Κοίλη Φλέβα Και Τοποθέτηση Αίματος Σε Σωληνάρια Περισυλλογής.</i>	<i>26</i>
<i>Εικόνα 11 Διατήρηση Πλάσματος Και Αιμολύματος Σε Φιαλίδια Eppendorf.</i>	<i>27</i>
<i>Εικόνα 12 Συντακτικός Τύπος της Γλουταθειόνης.</i>	<i>29</i>
<i>Εικόνα 13 Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.</i>	<i>29</i>
<i>Εικόνα 14: Μονοπάτι Αναγωγής Του H₂O₂ Σε H₂O</i>	<i>31</i>
<i>Εικόνα 15: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.</i>	<i>36</i>
<i>Εικόνα 16: Σύνδεση Πρωτεΐνης με την DNPH (Δίνιτριφαινυλδραζίνη) και Σχηματισμός του Δινιτροφαινυλδραζονίου.</i>	<i>38</i>
<i>Εικόνα 17: Τα Εργαλεία Που Χρησιμοποιήθηκαν Για Την Ομογενοποίηση Ιστών</i>	<i>40</i>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.

<i>Διάγραμμα 1: Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου Από Τη Μέρα Της Γέννησης Μέχρι Τη Θανάτωση Τους</i>	23
<i>Διάγραμμα 2: Αύξηση Στα Βάρη Των Χοίρων Σε Σχέση Με Το Χρόνο</i>	23
<i>Διάγραμμα 3 Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων</i>	25
<i>Διάγραμμα 4 Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης</i>	41
<i>Διάγραμμα 5 GSH στο Αιμόλυμα των Χοίρων (*$p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία).</i>	42
<i>Διάγραμμα 6 GSH στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	42
<i>Διάγραμμα 7 Καταλάση στο Αιμόλυμα των Χοίρων (*$p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).</i>	43
<i>Διάγραμμα 8 Καταλάση στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	43
<i>Διάγραμμα 9 TAC στο Πλάσμα των Χοίρων (*$p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).</i>	44
<i>Διάγραμμα 10 TAC στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	44
<i>Διάγραμμα 11 TBARS στο Πλάσμα των Χοίρων.</i>	45
<i>Διάγραμμα 12 TBARS στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	45
<i>Διάγραμμα 13 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο Πλάσμα των Χοίρων.</i>	46
<i>Διάγραμμα 14 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	46

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πιλοτική έρευνα καθώς είναι η πρώτη όπου πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε., προστίθενται στη διατροφή των χοίρων κρεατοπαραγωγής νεαρής ηλικίας, με σκοπό την αιματολογική και ιστολογική ανάλυση των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

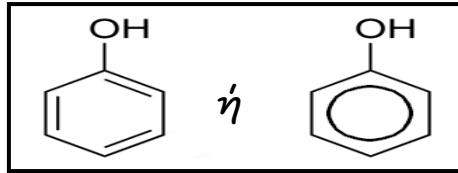
Τα Υ.Α.Ε. χαρακτηρίζονται από βαρύ φορτίο ρύπων, με κύριο ρυπαντή τις πολυφαινόλες (Mebirouk M., et. al., 2007; Tsimidou et. al. 1992; Ntougias et. al, 2013). Η ύπαρξη διάφορων πολυφαινολών ευθύνεται για το έντονο σκούρο χρώμα και τη χαρακτηριστική μυρωδιά των Υ.Α.Ε. Όταν απομονώνονται οι πολυφαινόλες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

1.1. Πολυφαινόλες.

1.1.1 Ορισμός.

Πολυφαινόλες – (Polyphenols). Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών. Η πρώτη αναφορά στον όρο «πολυφαινόλη» έγινε το 1894.

Η ομοιότητα τους στη μοριακή τους δομή αποτελεί η ύπαρξη τουλάχιστον μιας υδροξυλικής ομάδας, η οποία συνδέεται με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου (σχηματισμός φαινολικής ομάδας). Η ύπαρξη αυτών των φαινολικών ομάδων δίνει στο μόριο την ικανότητα εξουδετέρωσης Δραστικών Ειδών Οξυγόνου (Δ.Ε.Ο.) και άλλων οργανικών ή μη συστατικών (Perez-Jimenez et al., 2010) Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , η οποία αποτελεί την πιο απλή μορφή αυτής της ομάδας.



Εικόνα 1: Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.

1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.

Οι πολυφαινόλες είναι χαμηλού μοριακού βάρους και βρίσκονται συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

1.2. Φυτικές Πολυφαινόλες - Κατηγορίες.

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998; Perez-Jimenez et al. 2010) και βρίσκονται σε διάφορες ποσότητες σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και ροφήματα, όπως το κρασί, το τσάι, ο καφές και η σοκολάτα. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών (Perez-Jimenez et al., 2010; Christensen et al. 2012): φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, στυλβένια και λιγνίνες.

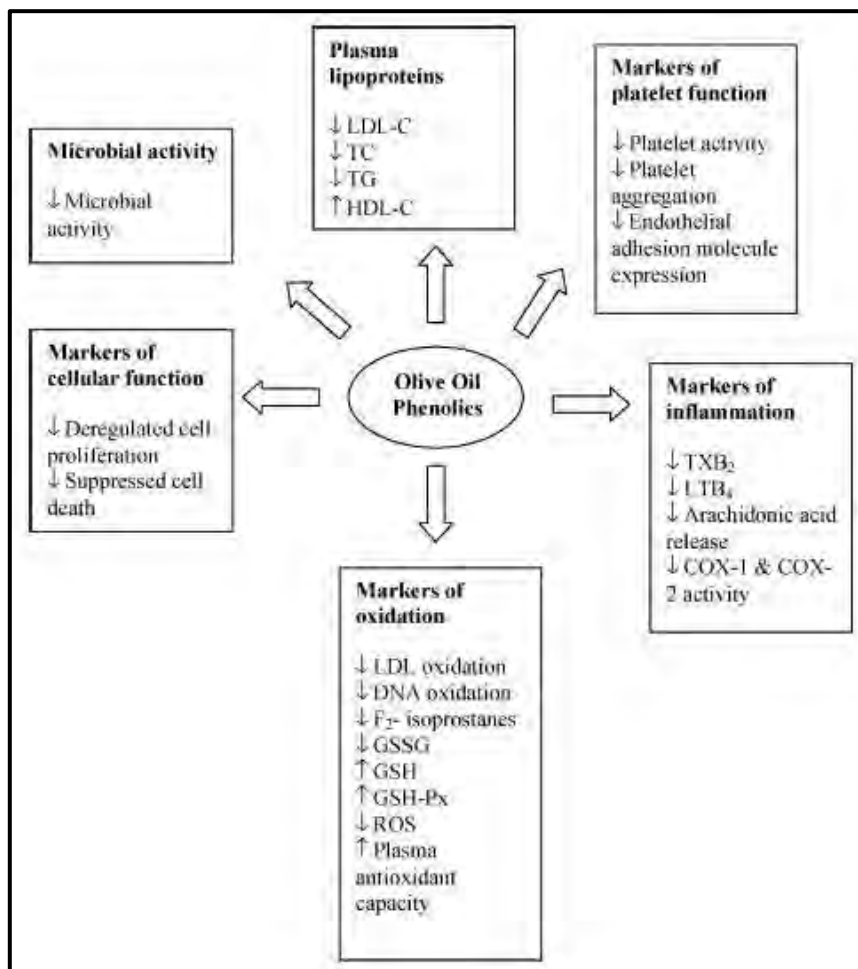
Η διαφορετικότητα τους έγκειται στο υδροξυλικό τους πρότυπο και μπορεί να είναι γλυκοσυλιωμένες ή/και ακετυλιωμένες. Το μέγεθος τους ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως τεράστια πολυμερή (όπως οι ταννίνες) (Perez-Jimenez et al., 2010).

1.3 Χημειοπροστατευτική δράση πολυφαινολών.

Από την αρχαιότητα ακόμη, σε πολιτισμούς όπως ο Ελληνικός, ο Αιγυπτιακός, ο Ρωμαϊκός, ο Κινέζικος και ο Ινδικός, ήταν γνωστές οι δράσεις κάποιων φυτών για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών (Klein et al., 2011; Chang et al., 2012, Wells et al., 2008). Εκατοντάδες χρόνια μετά, πληθώρα ερευνών αποδεικνύει μέρα με τη μέρα πως βιοδραστικά συστατικά των τροφών μπορούν να επηρεάσουν όλες τις καρκινικές διαδικασίες σε όλα τα στάδια του καρκίνου (Kushi et al., 2011; Lee et al., 2005; Kloetzel et al. 2013; Bidinotto et al., 2012; Chang et al., 2012; Arcidiacono et al., 2012; Pauwels, 2010; La Vecchia, 2004; La Vecchia, 2009).

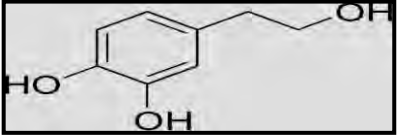
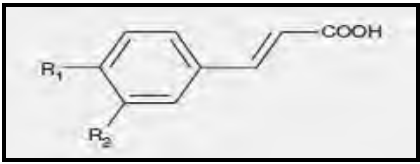
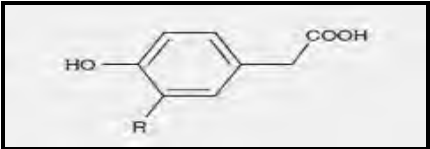
Η **χημειοπροστασία** ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg (20) και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Kushi et al., 2011; Kiani et al., 2005; Lee et al., 2005; Klein et al., 2011; Baliga et al., 2011; Brownell and Warner, 2009; Wang et al., 2012; Boubaker et al., 2012; Karpi et al., 2012; Bidinotto et al.,

2012; Verma and Shukla, 2013; Jones, 1986; Chrupek et al., 2012; Inoue and Tsugane, 2012; Kontou et al., 2012; Djuric, 2011; Couto et al., 2013; Bosetti et al., 2009; Gil et al., 2011). Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά, τα οποία είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού, η γονιδική ρύθμιση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Karpi et al., 2012) και δρουν ως αντιοξειδωτικά, ενώ θεωρούνται φυτοοιστρογόνα, γιατί έχουν παρόμοια δράση με τις ορμόνες. Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν πως μόνο ένα συστατικό της τροφής δε φτάνει για να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αλλά είναι ο συνδυασμός των συστατικών που βρίσκονται σε όλη την υγιεινή διατροφή που εμφανίζουν αυτή την ικανότητα (Banerjee et al., 2006, Baliga et al., 2011; Alexander and Cushing, 2009; Kumar et al., 2012; Cristensen et al., 2012; Kontou et al., 2012; Giacosa et al., 2012).

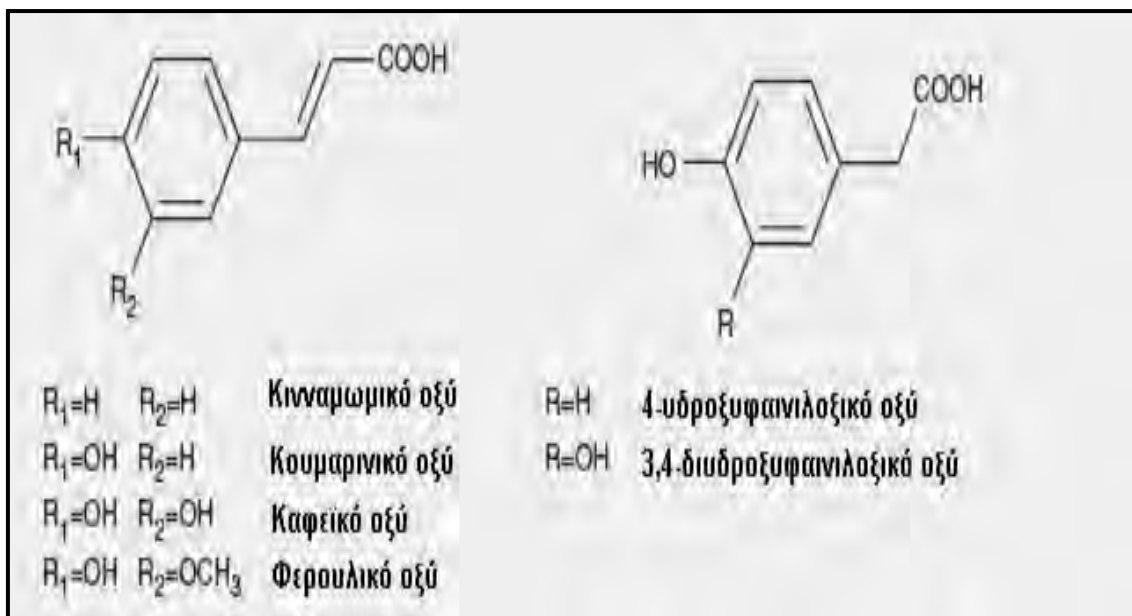


Εικόνα 2: Βιολογικές Ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Cicerale et al., 2008)

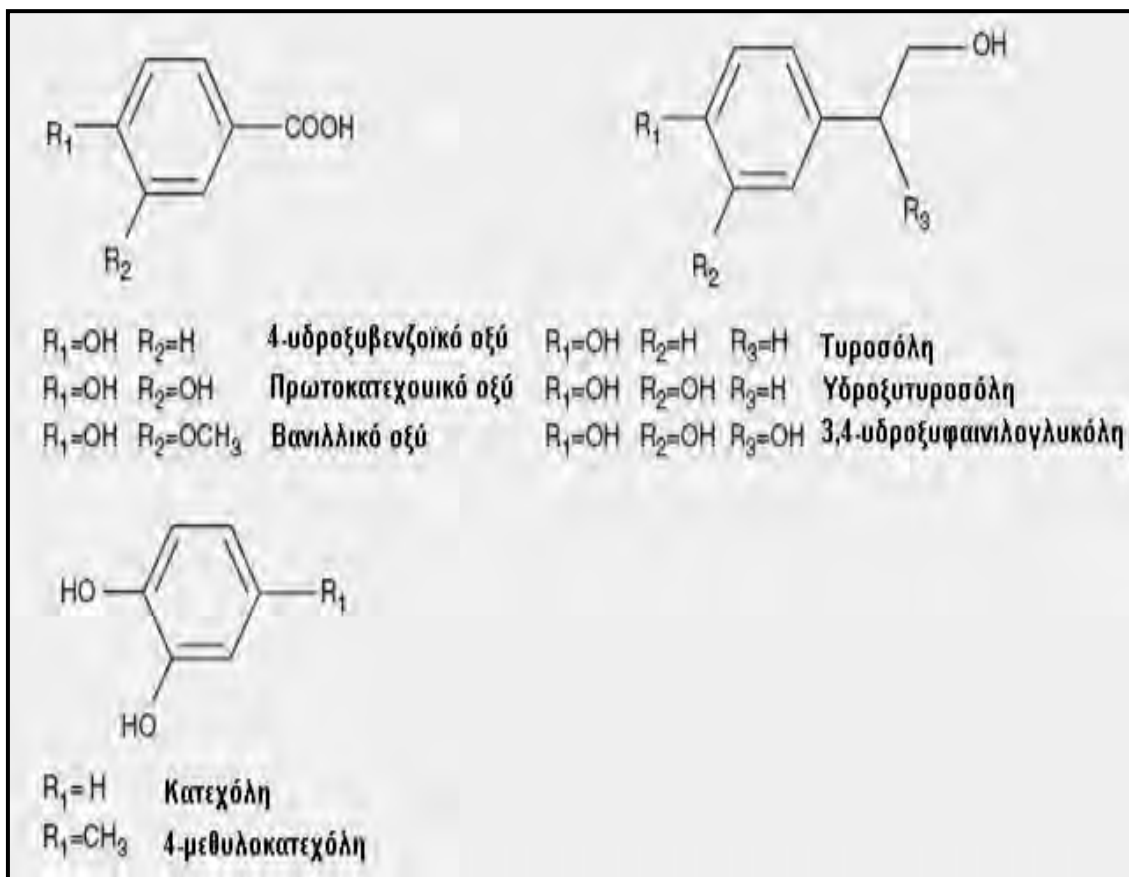
Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν τόσο ανάλογα με το είδος του φυτού, όσο και στα διάφορα μέρη του. Τα ΥΑΕ περιέχουν πολυφαινόλες, των οποίων οι κυριότερες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Κατηγορία	Πολυφαινόλες	Χημικοί Τύποι
Υ.Α.Ε.	Υδροξυτυροσόλη	
	Καφεϊκό Οξύ	
	Υδροξυφαινολικό Οξύ	

Πίνακας 1: Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ.



Εικόνα 3: Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συνατώνονται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Νιαουμπάκης & Χαλβαδάκης, 2006) [συνέχεια στην επόμενη σελίδα].



Εικόνα 4: Συνέχεια από: Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

1.3 Οξειδωτικό Στρες.

1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.

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

Το O₂ είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.3.2 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O_2 .

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Ατομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. 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. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1990). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και

συμβολίζεται με *O₂. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman et al., 1993; Gutteridge, 1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil et al., 2012; Vainio et al., 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου (O₂^{•-}),
- η ρίζα υδροξυλίου (-OH[•]),
- η ρίζα υπεροξειδίου (-ROO[•]),
- το O₂ απλής κατάστασης,
- το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)
- και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται φυσιολογικά μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού, έχουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου και την προστασία του οργανισμού σε μολύνσεις (Pal et al., 2010; Kiani et al., 2005; Ibiebele et al., 2013; Shim et al., 2012; Niclis et al., 2011; Lin and Cai, 2012; Cicerale et al., 2008; Vainio et al., 1999; Wells et al., 2008). Όπως συμβαίνει σε καταστάσεις stress, οι ελεύθερες ρίζες αυξάνονται, προκαλώντας εκτεταμένες βλάβες στο γενετικό υλικό, σε πρωτεΐνες και σε λιπίδια (Lee et al., 2005; Cicerale et al., 2008; Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010; Vainio et al., 1999; Khalluki et al., 2003). Αν αυτές οι βλάβες δε διορθωθούν από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που έχει το κύτταρο, προκαλούν σοβαρές επιπτώσεις στο κύτταρο (Kushi et al., 2011; Kiani et al., 2005; Klein et al., 2011; Takata et al., 2013; Kumar et al., 2012; Arab, 2011; Karpi et al., 2012; Long et al., 2013; Verma and Shukla, 2013; Niclis et al., 2011; Lin and Cai, 2012; Ouedraogo et al., 2011; Bozkurt et al., 2012; Lye and Hayslip, 2012; Li and Tollefsbol, 2010; Wells et al., 2008).

Οι κυριότεροι φυσιολογικοί μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

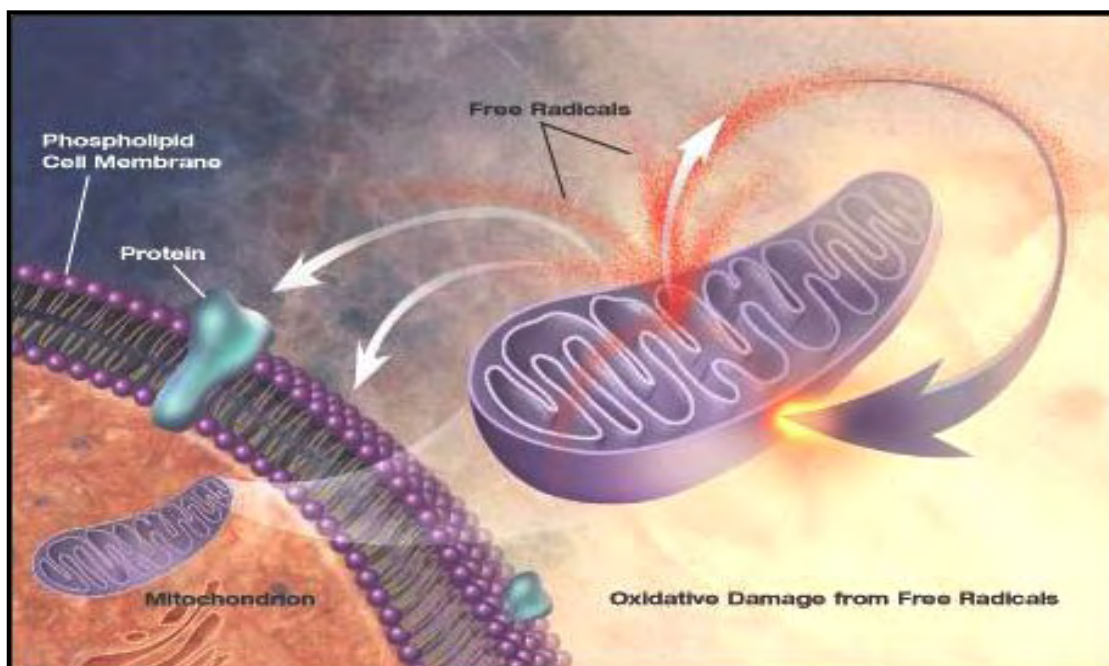
(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια

στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξειδίο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010; Fujisawa et al., 2004; Weisburger, 2001; AICR, 2007).

(β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων (Kiani et al., 2005; Klein et al., 2011, Kumar et al., 2012; Li and Tollefsbol, 2010; Pani and Galeotti, 2010).

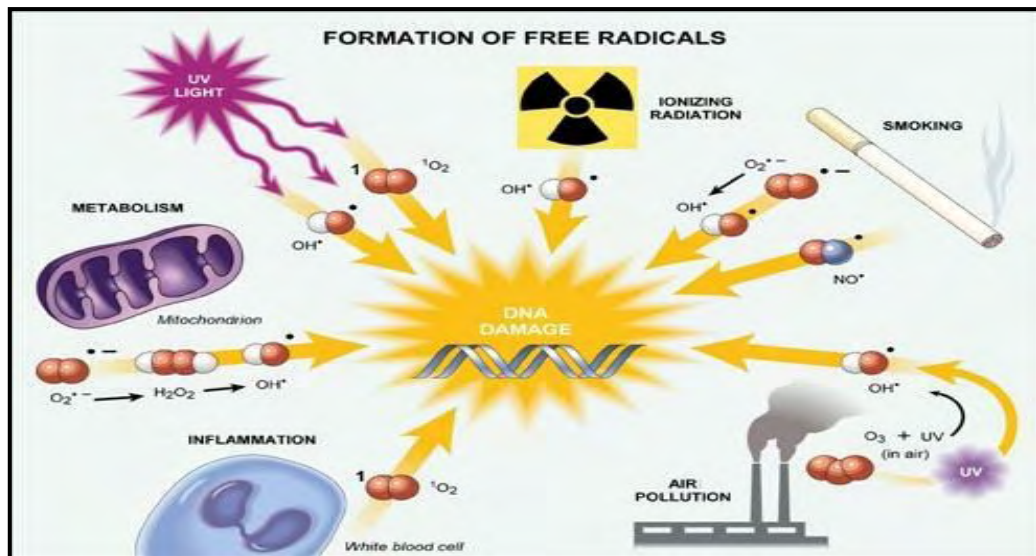
(γ) Την παραγωγή των ιδιαίτερων δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων (Pani and Galeotti, 2010; Battin et al., 2009; Cooke et al., 2013; AICR, 2007).

(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (Pani and Galeotti, 2010; Cooke et al., 2013; Fujisawa et al., 2004; Vainio et al., 1999).



Εικόνα 5: Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.

Μια άλλη σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελούν πολλοί εξωτερικοί παράγοντες, όπως ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία) (Battin et al., 2009).



Εικόνα 6: Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών (Cicerale et al., 2008; AICR, 2007). Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική ουσία** κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001). Επιπλέον, για να είναι μια ουσία αντιοξειδωτικό πρέπει να προσφέρει ανοχή έναντι του οξειδωτικού στρες, μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων κι άλλων μηχανισμών, προλαμβάνοντας την εμφάνιση ασθενειών (Kushi et al., 2011; Ibiebele et al., 2013; Klein et al., 2011; Baliga et al., 2011; Chen and Ross, 2012; Giaginis and Theocharis, 2011; Lin and Cai, 2012; Bozkurt et al., 2012; Ouyang et al., 2012; AICR, 2007).

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους (Baliga et al., 2011; Long et al., 2013; Hamizah et al., 2012):

- παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού,

όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση (AICR, 2007; Khalluki et al., 2003).

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004; AICR, 2007).

Το οξειδωτικό στρες **προκαλείται** συνήθως από:

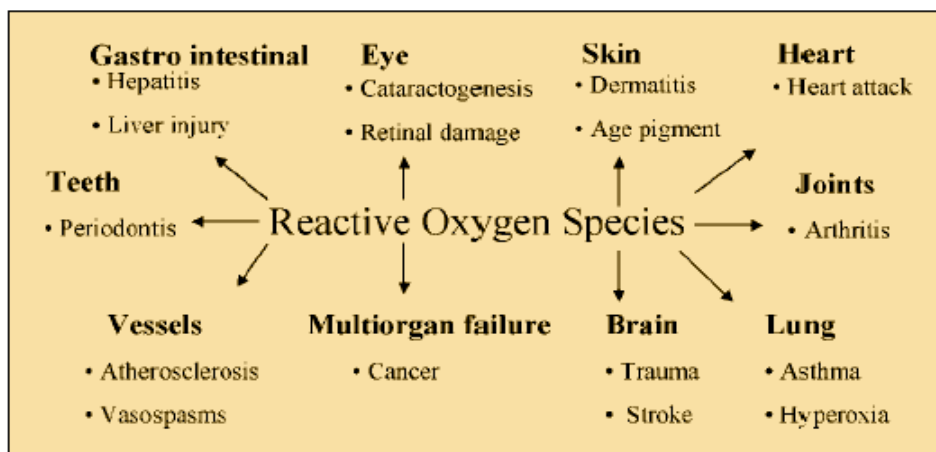
- Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης (Aqil et al., 2012). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, οι ελεύθερες ρίζες ευθύνονται για την πρόκληση και εμφάνιση πολλών ασθενειών, με το κατάλογο αυτών συνεχώς να αυξάνεται (Halliwell, 2001).



Εικόνα 7: Κλινικές Καταστάσεις Με Τις Οποίες Έχει Βρεθεί Ότι Σχετίζονται Τα ROS (Lee et al., 2003).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στο οποίο οι οξειδωτικοί μηχανισμοί έχουν κρίσιμο ρόλο αποτελεί ο καρκίνος (Cooke et al., 2003), ο οποίος είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία προκαλείται από συστηματικές και συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε σημαντικά γονίδια που παίρνουν μέρος στις κυτταρικές διαδικασίες (Pal et al., 2010; Kushi et al., 2011; Lee et al., 2005; Shafique et al., 2012; Kloetzel et al., 2013; Bidinotto et al., 2012; Ou et al., 2012; De Stefani et al., 2012; Mendivil-Perez et al., 2013; Chang et al., 2012). Τα τρίτα στάδια του καρκίνου είναι η έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η εξέλιξη (progress). Η **έναρξη** (initiation) συμβαίνει όταν το κύτταρο εκτίθεται σε ένα μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Αυτή η μεταλλαγή μπορεί να είναι μια κληρονομήσιμη μετάλλαξη, ένας εξωγενής ή ενδογενής παράγοντας (πχ προϊόν οξειδωτικού μεταβολισμού). Η έκθεση σε ένα καρκινογόνο που προκαλεί μεταλλάξεις στο DNA δημιουργεί σύμπλοκα με το DNA. Αν δεν επιδιορθωθούν αυτές οι μεταλλάξεις, αυτά τα σύμπλοκα θα μεταφερθούν με τη διαδικασία της διαίρεσης στο θυγατρικό κύτταρο και θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Μόνο η μύηση δεν είναι αρκετή για την ανάπτυξη καρκίνου, αλλά χρειάζεται το κύτταρο να μεταβεί στο επόμενο στάδιο, την προαγωγή (Pal et al., 2010; Kushi et al., 2011; Klein et al., 2011; Bidinotto et al., 2012; Ou et al., 2012; De Stefani et al., 2012; Mendivil-Perez et al., 2013; Chang et al., 2012). Η **προαγωγή** (promotion) είναι η διαδικασία κλωνικής επέκτασης του αρχικού μεταλλαγμένου κυττάρου και η μετατροπή του σε νεοπλαστικό. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αρχικών μεταλλαγμένων κυττάρων, τόσο μεγαλώνει κι ο κίνδυνος μετάβασης σε αυτό το δεύτερο στάδιο της καρκινογένεσης. Σε αυτό το στάδιο, καθοριστικής σημασίας είναι η έκθεση των αρχικών μεταλλαγμένων κυττάρων με έναν παράγοντα προώθησης, με αποτέλεσμα τροποποιήσεις στο ρυθμό του πολλαπλασιασμού ή επιπρόσθετες βλάβες στο DNA, οι οποίες να ευθύνονται για τροποποιήσεις στην έκφραση γονιδίων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η **εξέλιξη** (progression) είναι το τελευταίο μη αντιστρεπτό στάδιο του καρκίνου, όπου τα κύτταρα που προέρχονται κι από τα δύο προηγούμενα στάδια μεγαλώνουν και εκτείνονται για να σχηματίσουν μια μάζα όγκων. Στη συνέχεια, αποκτούν επιθετικά χαρακτηριστικά οδηγώντας σε κλωνοποίηση, επέκταση και μετάσταση (Pal et al., 2010; Kushi et al., 2011; Bidinotto et al., 2012; Ou et al., 2012; Chang et al., 2012).

Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχει εξετάσει πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν. (Stagos et al., 2012). Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos et al., 2007, Spanou et al. 2007), με αποτέλεσμα αυτά τα εκχυλίσματα να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Τέλος,

επηρεάζαν τη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou et al., 2012; Spanou et al., 2008).

1.4 Σκοπός.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσθήκη πολυφαινολικών προσθέτων στο σιτηρέσιο χοίρων κρεατοπαραγωγής στην περίοδο απογαλακτισμού, από επεξεργασμένα Υ.Α.Ε. και η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα, στο αιμόλυμα και στον ηπατικό ιστό, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους σε νεαρή ηλικία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά.

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

- Εκτροφή χοιριδίων (Εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).

Στις 12 Οκτωβρίου 2013 γεννήθηκαν έντεκα (11) χοίροι από μια (1) χοιρομητέρα. Το γενετικό υπόβαθρο της χοιρομητέρας προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X Large White – Duroc – Pietrain (πατέρας).



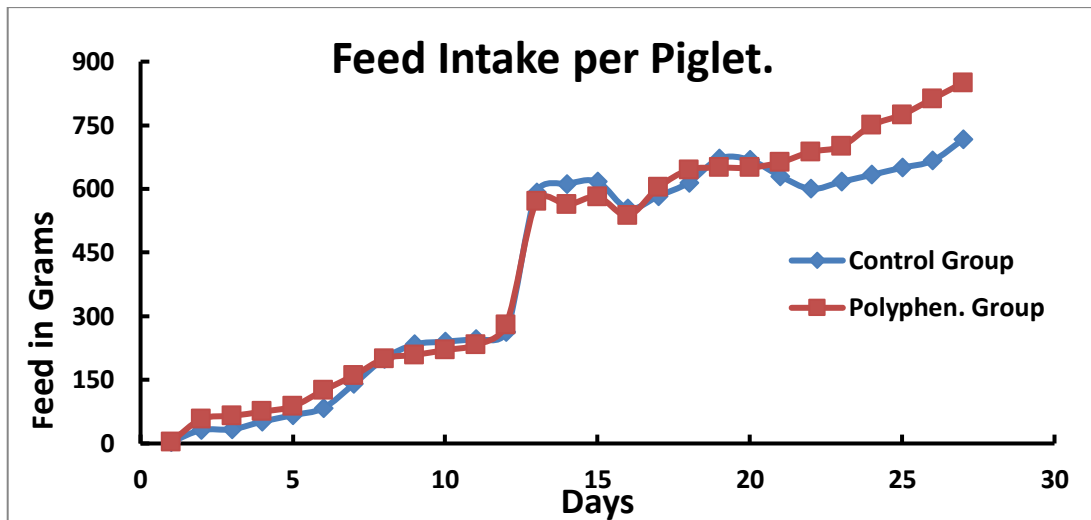
Εικόνα 8: Οι Χώροι Εγκατάστασης Στις Οποίες Εκτράφηκαν οι Χοίροι Που Συμμετείχαν Στην Παρούσα Μελέτη.

Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο ο τρόπος θανάτωσης του για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

- Παρακολούθηση ανάπτυξης χοίρων (Ημερήσια αύξηση ζωϊκού βάρους, ημερήσια κατανάλωση τροφής).

Στις 31 Δεκεμβρίου 2013 και δεκαεννέα (19) ημέρες από τη γέννησή τους, ξεκίνησε ο απογαλακτισμός τους και τα επτά (7) εναπομείναντα χοιρίδια, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, εκ των οποίων τρία (3) επιλέχθηκαν στην ομάδα Α (ελέγχου) και τέσσερα (4) στην ομάδα Β, όπου στο σιτηρέσιό της υπήρχαν πολυφαινολικά πρόσθετα.

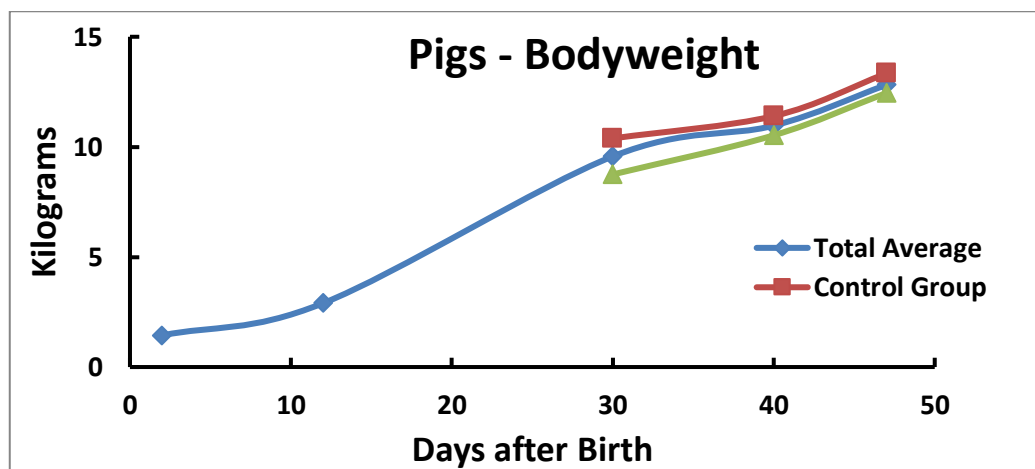
Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του απογαλακτισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά από τη χοιρομητέρα τους σε διαφορετικά κελιά για χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη βδομάδα του απογαλακτισμού (στις 6 Νοεμβρίου 2013) η καθημερινή απομάκρυνση από τη χοιρομητέρα αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες, με τελική απομάκρυνση της χοιρομητέρας να έγινε στις 13 Νοεμβρίου 2013. Συγχρόνως όλες αυτές τις μέρες γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια απογαλακτισμού, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου Από Τη Μέρα Της Γέννησης Μέχρι Τη Θανάτωση Τους.

Όπως βλέπουμε χαρακτηριστικά στο διάγραμμα 1, μετά την απομάκρυνση της χοιρομητέρας, η κατανάλωση και των δύο σιτηρεσίων υπερδιπλασιάστηκε.

Πέρα από την ημερήσια μέτρηση της κατανάλωσης σιτηρεσίου γινόταν και καθημερινές μετρήσεις στα βάρη των χοίρων. Στο διάγραμμα 2 που ακολουθεί φαίνεται η εκθετική αύξηση στα βάρη των χοίρων με το πέρας των ημερών και μέχρι το τέλος του πειράματος.



Διάγραμμα 2: Αύξηση Στα Βάρη Των Χοίρων Σε Σχέση Με Το Χρόνο

- Εκτέλεση πέντε (5) αιμοληψιών (στις 14 και 24 Οκτωβ.2013, στις 14, 24 και 28 Νοεμβρίου 2013) και τρεις (3) λήψεις ηπατικού ιστού (στις 14 και 24 Οκτωβρίου 2013, στις 28 Νοεμβρ. 2013) στο Μικροσφαγείο που υπάρχει στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

Η πρώτη αιμοληψία έγινε στις 14 Οκτωβρίου 2013 σε δύο (2) χοιρίδια ηλικίας δύο (2) ημερών και βάρους 0,950 και 1,560 kg. Χρησιμοποιήθηκε το αναισθητικό φάρμακο Xyloran® (Vetoquinol S.A., France) για να διασφαλιστεί ότι προκαλείται ο ελάχιστος δυνατός αναπόφευκτος πόνος, ταλαιπωρία ή αγωνία (Οδηγίες 2010/63/ΕΕ) και η θανάτωση έγινε στην εγκατάσταση του εκτροφέα από αρμόδιο, εκπαιδευμένο πρόσωπο. Η δεύτερη αιμοληψία έγινε δέκα 10 μέρες μετά

(στις 24 οκτωβρίου 2013) σε δύο (2) χοιρίδια δώδεκα (12) ημερών και βάρους 2,700 και 2,950 kg. Η τελευταία αιμοληψία έγινε στις 28 Νοεμβρίου 2013, σαράντα οχτώ (48) μέρες από τη γέννηση τους σε έξι (6) χοιρίδια. Ένα (1) χοιρίδιο επιλέχθηκε να αναπτυχθεί σε χοιρομητέρα, με σκοπό να εκτελεστούν μετρήσεις και στη δεύτερη (2^η) γενιά.

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

- Ταχεία και ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων των αιμοληψιών (120 δείγματα) και των ιστών, καθώς και η τοποθέτησή τους σε ψυγείο στους -80°C.
- Επεξεργασία του αίματος (Λήψη πλάσματος – αιμολύματος) και ομογενοποίηση ιστών.
- Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.

2.2 Περιγραφή σιτηρεσίου.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η σύσταση καθενός σιτηρεσίου, καθώς και οι μεταξύ τους διαφορές.

<u>ΤΡΟΦΕΣ</u>	ΠΟΣΟΣΤΟ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ %
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ Α	50,0
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ 42/8	20,0
ΚΡΙΘΑΡΙ	5,5
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 72	7,0
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ 11%	15,0
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	Prevent Piglets Corn 2,5%
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 2: Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας Α (ελέγχου).

Το σιτηρέσιο της ομάδας Β, περιείχε κατά 2/3 το σιτηρέσιο της Α Ομάδας και κατά 1/3 το παρακάτω σιτηρέσιο.

<u>ΤΡΟΦΕΣ</u>	ΠΟΣΟΣΤΟ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ %
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ Β	55,2
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ 42/8	31,8
ΛΙΠΟΣ ΣΚΟΝΗ (Λεκιθίνη)	5,0
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ 70/10	4,0
ΜΑΡΜΑΡΟΣΚΟΝΗ	1,5
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ	Prevent Piglets Corn 2,5%
ΣΥΝΟΛΟ	100

Πίνακας 3: Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας (Β) με Πολυφαινολικά Πρόσθετα.

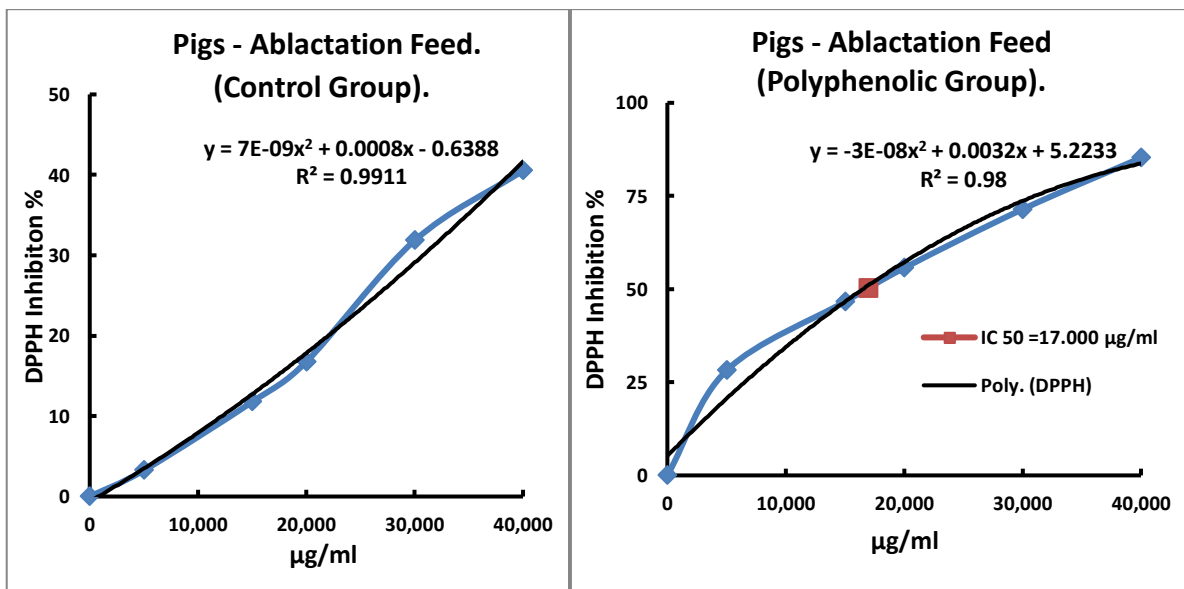
Ως καλαμπόκι Β, αναφέρεται το ενσίρωμα όπου περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι μια μέθοδος διατήρησης των χλωρών ζωοτροφών σε αναερόβιες συνθήκες.

Καλαμπόκι Β: (Κατακράτημα επεξεργασμένων υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου, πολυφαινολοποιημένο με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.



Εικόνα 9 Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσσκευή Αποσυμπίεσης.

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



Διάγραμμα 3 Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων

Παρατηρείται ότι ενώ στο σιτηρέσιο της ομάδας ελέγχου ακόμα και στα 40mg/ml η αναστολή της ρίζας είναι στα 40,5%, στο σιτηρέσιο της ομάδας με τα πολυφαινολικά πρόσθετα το IC₅₀ της ρίζας επιτυγχάνεται στα 17 mg/ml. Αυτό σημαίνει ότι το σιτηρέσιο της ομάδας που

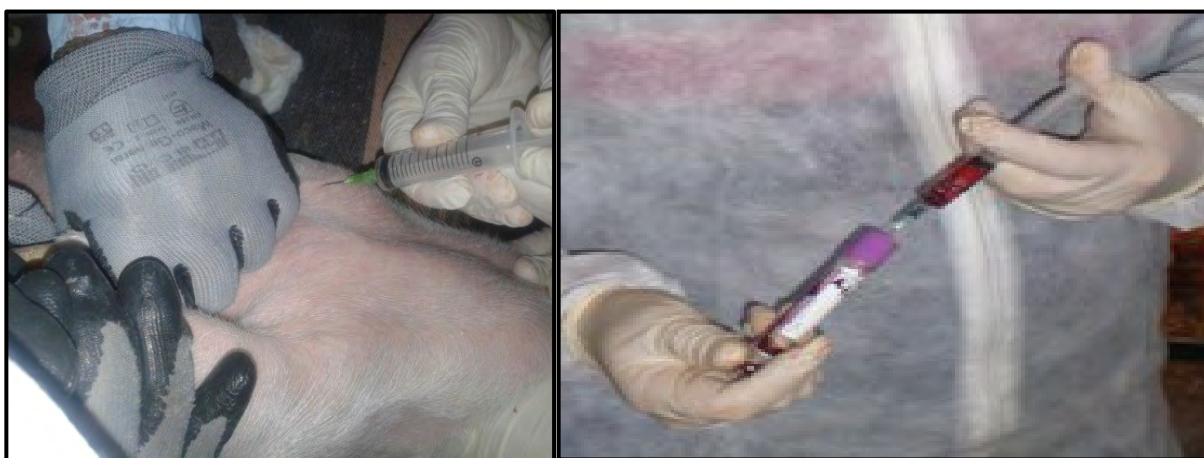
καταναλώνει τα πολυφαινολικά πρόσθετα εμφανίζει περίπου τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση από αυτό της ομάδας ελέγχου.

2.3 Αιμοληψία.

Εκτελέστηκαν πέντε (5) αιμοληψίες ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Framstad et al. (1988), όταν τα χοιρίδια ήταν ηλικίας 2, 12 και 48 ημερών, τα οποία κατανάλωναν τα σιτηρέσια που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν (ομάδα ελέγχου ή πολυφαινολών). Σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή για τη συλλογή αίματος από το Πανεπιστήμιο της Άιοβας, η μέγιστη ποσότητα του αίματος που μπορεί να συλλεχθεί από ένα υγιές χοιρίδιο είναι το 1% του σωματικού του βάρους. Έτσι, για τις πειραματικές ανάγκες αποφασίστηκε να λαμβάνονται 4 ml αίματος. Χρησιμοποιήθηκαν:

- Μιας χρήσεως σύριγγες με βελόνα (Penta Ferte®), χωρητικότητας 5 ml, που μετά τη χρήση τους απομακρύνονταν σε δοχεία περισυλλογής αιχμηρών αντικειμένων.

- Μιας χρήσεως αποστειρωμένα σωληνάρια συλλογής αίματος, (BD Vacutainer® EDTA Tubes, με Ref. Nr. 3668860), που περιείχαν 7,2 mg K3E. Το αντιπηκτικό EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα με χηλίωση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.



Εικόνα 10 Αιμοληψία Από Πρόσθια Κοίλη Φλέβα Και Τοποθέτηση Αίματος Σε Σωληνάρια Περισυλλογής.

Το αίμα από τα χοιρίδια λαμβάνονταν από δύο διαφορετικές φλέβες ανάλογα αν το ζώο θανατώνονταν ή όχι. Στην πρώτη κατηγορία, το αίμα λαμβάνονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα, αφού έχει προηγηθεί αναισθησία και θανάτωση σύμφωνα με τους κανονισμούς περί θανάτωσης εργαστηριακών ζώων που αναφέρονται στις Οδηγίες 2010/63/EE. Στη δεύτερη περίπτωση, όπου το χοιρίδιο ζούσε, το αίμα λαμβάνονταν από την πρόσθια κοίλη φλέβα και η περιοχή της αιμοληψίας καθαριζόταν με 70% αλκοόλη (αντισηπτικό). Η βελόνα εισχωρούσε προοδευτικά στη φλέβα και γινόταν η εξαγωγή του αίματος.

Το αίμα μεταφέρονταν σε σωληνάρια συλλογής, που περιείχαν αντιπηκτικό και ανακατεύονταν απαλά αναστρέφοντας τον σωλήνα αρκετές φορές. Αυτό διασφάλιζε τη σωστή ανάμιξη του αντιπηκτικού με το αίμα. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο που έφεραν παγοκύστες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο άμεσα, μετά το πέρας της αιμοληψίας.

2.4. Επεξεργασία Αίματος.

Στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελείτο επεξεργασία των δειγμάτων για τη συλλογή αιμολύματος και πλάσματος. (Ramnath, et. al., 2007). Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και στο πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Περιγραφή Μεθόδου.

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1.370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4.020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L).
6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.



Εικόνα 11 Διατήρηση Πλάσματος Και Αιμολύματος Σε Φιαλίδια Eppendorf.

Στη συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

1. Προσθέτουμε 500 μl αιμολύματος σε 500 μl 5% TCA σε eppendorf και ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε eppendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της γλουταθειόνης.

2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

2.5.1. Γενικά.

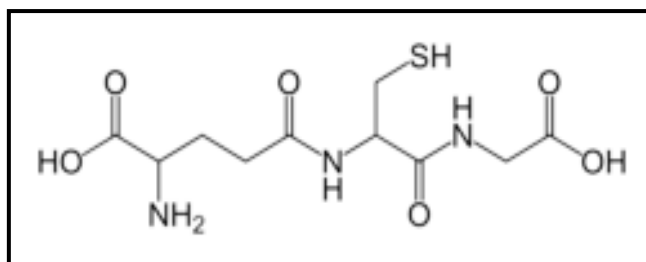
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Για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

2.5.2. Μέθοδοι.

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

2.5.2.1 GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM (Battin et al., 2009). 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), με την τελευταία (GSSG) να αποτελεί το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).

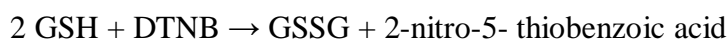


Εικόνα 12 Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.

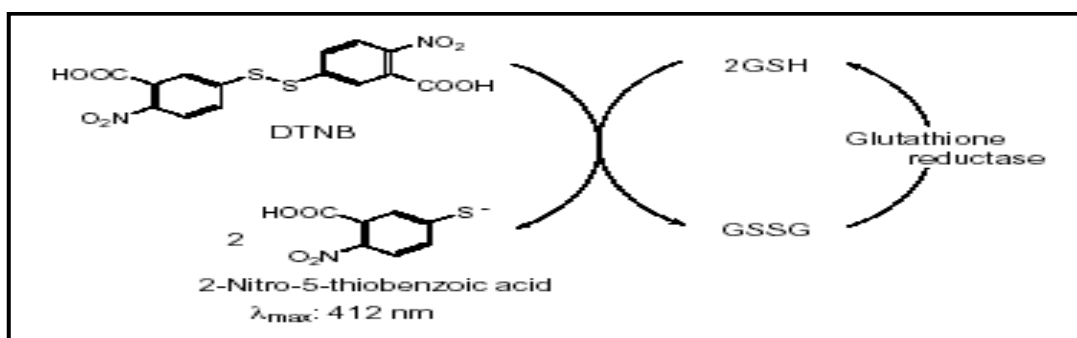
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων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

2.5.2.2 Αρχή της μεθόδου.

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



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



Εικόνα 13 Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

2.5.2.3 Αντιδραστήρια.

• **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως

αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

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

• **Κιτρικό Νάτριο**. ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

2.5.2.4 Πειραματικό πρωτόκολλο.

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	-
Αιμόλυμα	-	20 μL

Πίνακας 4: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της GSH.

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Beers and Sizer, 1952)

2.5.2.5 Υπολογισμοί.

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Absδείγματος} - \Delta\text{Abstuφλού} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL.

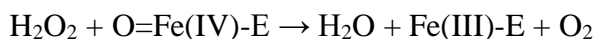
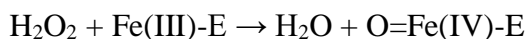
Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι λαμβάνουμε τη συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης. GSH (mmol/ g Hb).

2.5.3 Δραστηριότητα της Καταλάσης.

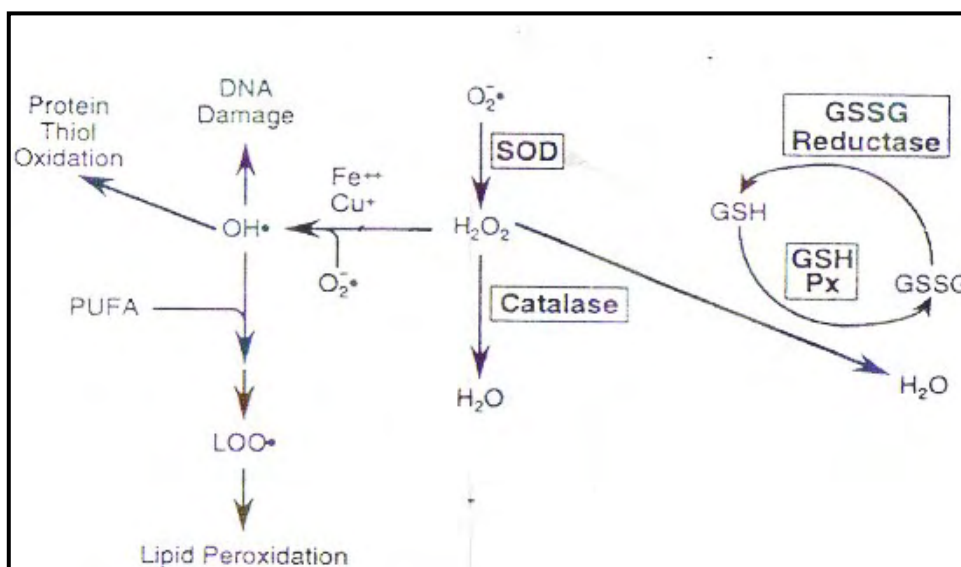
2.5.3.1 Αρχή της μεθόδου.

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon et. al., 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



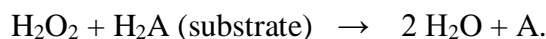
(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 14: Μονοπάτι Αναγωγής Του H_2O_2 Σε H_2O

Επίσης, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



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

2.5.3.2 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% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).** Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

2.5.3.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2.991 μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

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

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

2.5.3.4 Υπολογισμοί

Δραστηριότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (ΔAbs_{sample} per min / 40) x (750 x 1.000 x 10 x 2) / Conc. Hb (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1.000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσεως

που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3.000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3.000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{Abs (min)} = \eta$ μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

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

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

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

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια (εξαιρέση αποτελούν οι θειόλες). Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

2.5.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH \cdot) 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.

2.5.4.2 Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- **DPPH 0.1 mM.** MB: 394.32. Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραίωσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

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

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

2.5.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-
Πλάσμα	-	-	20 μL

Πίνακας 6: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της TAC.

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH

μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20.000 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.

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

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 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1.000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

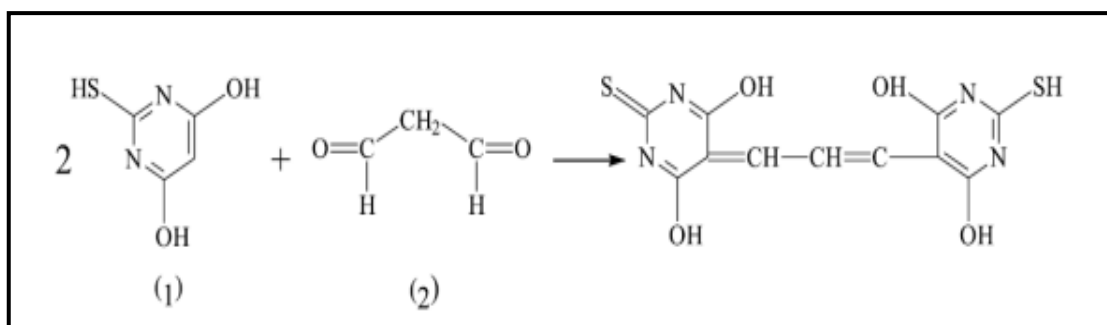
δ) Διαιρούμε με το 1.000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1.000 = 0.5 \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος}$ ή $0.5 \text{ mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή 0.5 mmol DPPH/L .

2.5.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

2.5.5.1 Αρχή της μεθόδου.

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



Εικόνα 15: 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.

2.5.5.2 Αντιδραστήρια.

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

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

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

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

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

2.5.5.3 Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (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

Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

2.5.5.4 Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 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 to μmol/L.

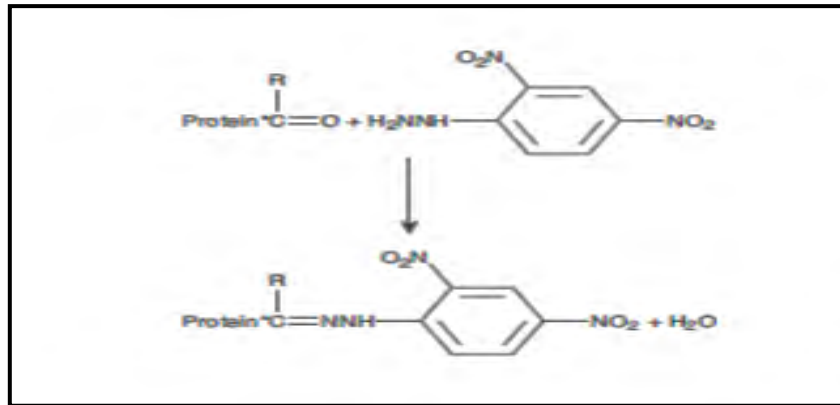
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

2.5.6 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.5.6.1 Αρχή της μεθόδου.

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

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



Εικόνα 16: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

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

2.5.6.2 Αντιδραστήρια

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

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

- **DNPΗ 14 mM.** (MB: 198.1)

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

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

2.5.6.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

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

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

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

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

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

2.5.6.4 Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1.000/50 \times 2$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM \times cm⁻¹. Το 1.000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1.000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). $\times 2$ διότι προσθέτουμε (αραιώση 1/1 TCA TCA 20% αρχικά).

2.6 Ομογενοποίηση Ιστών.

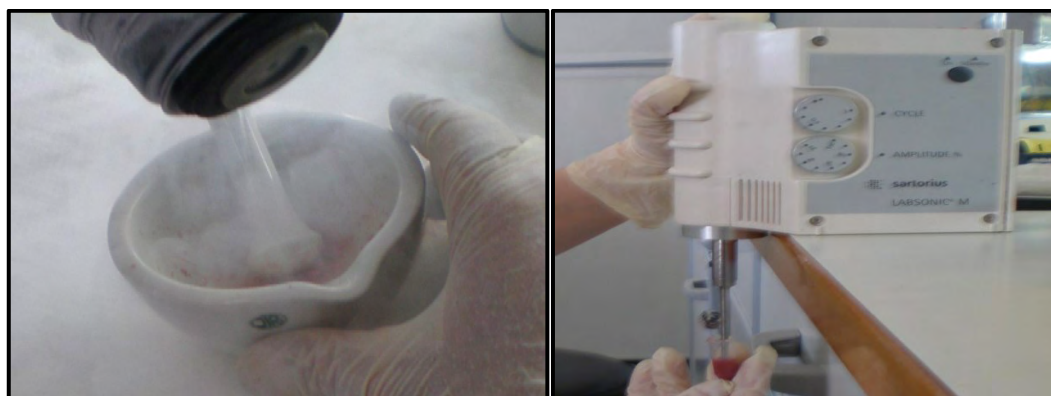
Μετά τη μέτρηση των δεικτών στο αίμα, εκτελέστηκε μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στους ηπατικούς ιστούς. Προηγουμένως, όμως, έπρεπε να πραγματοποιηθεί ομογενοποίηση

στα δείγματα του ηπατικού ιστού, που αφαιρέθηκαν χειρουργικά, τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes 2 mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι.

Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH), όπως:

- Απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.
- Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη.
- PMSF (9mg/mL), κλπ.

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



Εικόνα 17: Τα Εργαλεία Που Χρησιμοποιήθηκαν Για Την Ομογενοποίηση Ιστών

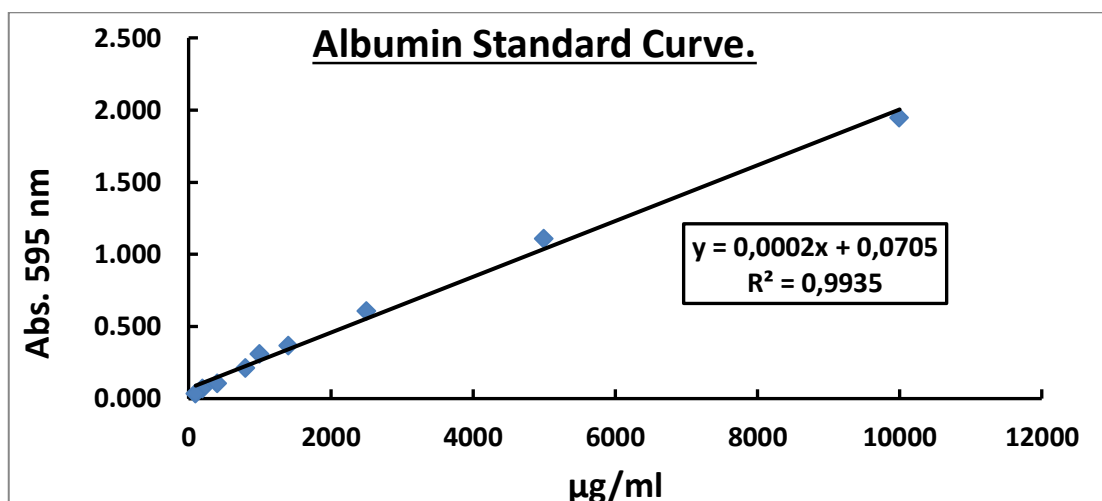
Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.

2.6.1. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Ηπατικό Ιστό.

2.6.1.1. GSH.

Η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω, με την διαφορά πως κατά την διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων προς μέτρηση, εκτελείται μία (1) φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου ιστού, αφού προστεθεί ίση ποσότητα TCA 5%, αντί για δύο (2) που απαιτούνται στο αίμα.

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



Διάγραμμα 4 Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης

2.6.1.2. Δραστηριότητα της Καταλάσης.

Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτήν του αιμόλυματος, πλην όμως αντί για αιμόλυμα 4 µL αραιωμένου 1/10, προσθέτουμε 40 µL ομογενοποιημένου ιστού, αραιωμένου 1/3 με PBS. Αντί για 2.991 µL Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4, προσθέτουμε σε κάθε δείγμα προς μέτρηση 2.955 µL buffer. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του H₂O₂ στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM. Επειδή στα δέκα (10) ηπατικά δείγματα, η αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου γίνονταν σε πολύ μικρότερο χρόνο από αυτόν των δύο (2) λεπτών της ώρας, στον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου, ελήφθη υπόψη, ξεχωριστά ο χρόνος αντίδρασης για κάθε δείγμα.

2.6.1.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).

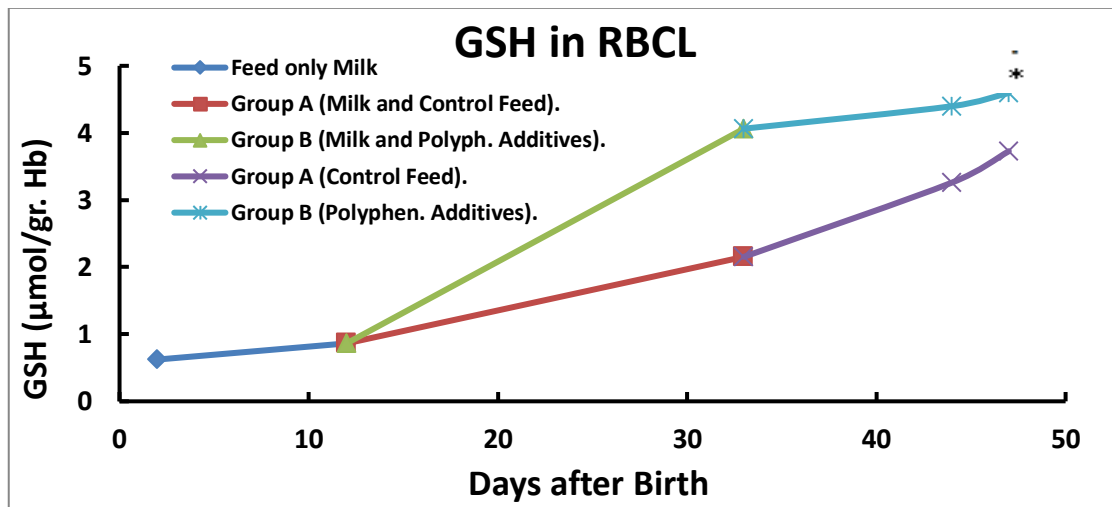
Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτήν του αίματος, πλην όμως αντί για 20 µl πλάσματος, τοποθετούμε στα προς μέτρηση δείγματα, 40 µl ομογενοποιημένου ηπατικού ιστού, αραιωμένου 1:2 με PBS.

TBARS – Καρβονόλια.

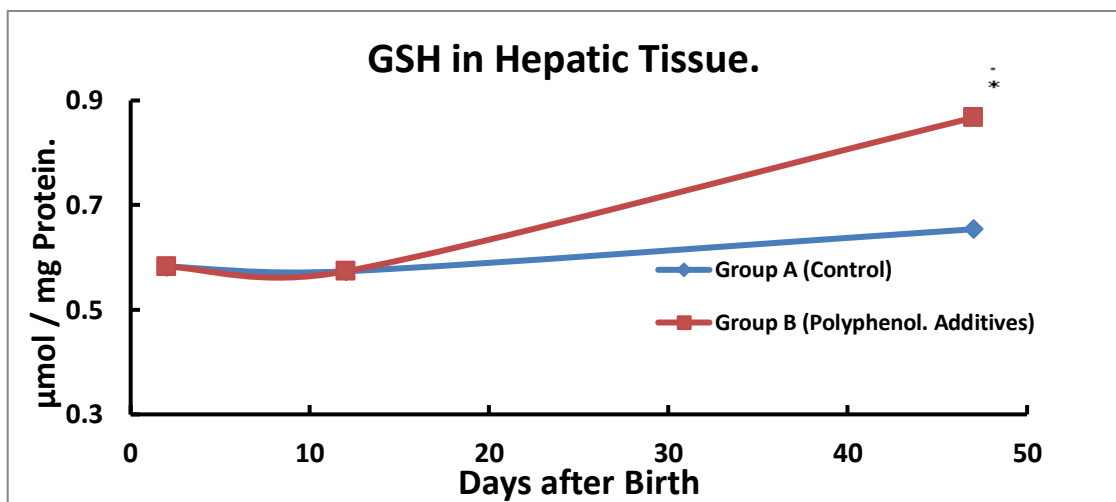
Οι μετρήσεις των δύο παραπάνω δεικτών στον ηπατικό ιστό, εκτελέστηκαν ακριβώς όπως και στις μετρήσεις στο πλάσμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Στα διαγράμματα 5 έως 14 που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων στο αίμα, το πλάσμα και τον ηπατικό ιστό στους χοίρους που συμμετείχαν στο συγκεκριμένο πείραμα.



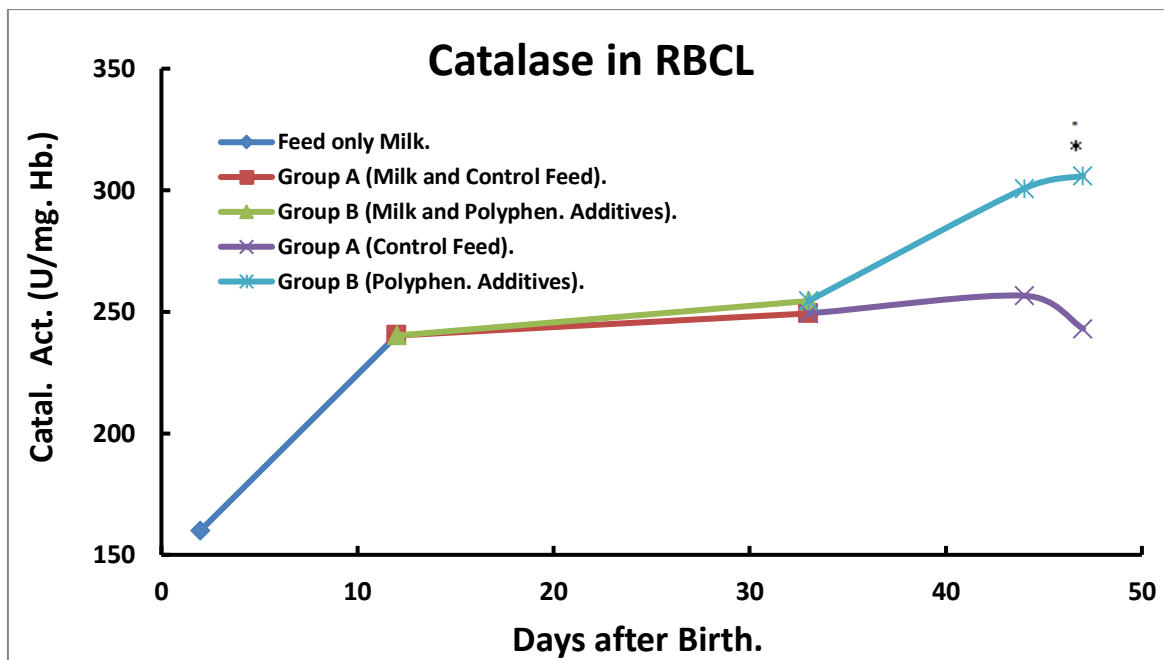
Διάγραμμα 5 GSH στο Αιμόλυμα των Χοίρων (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία).



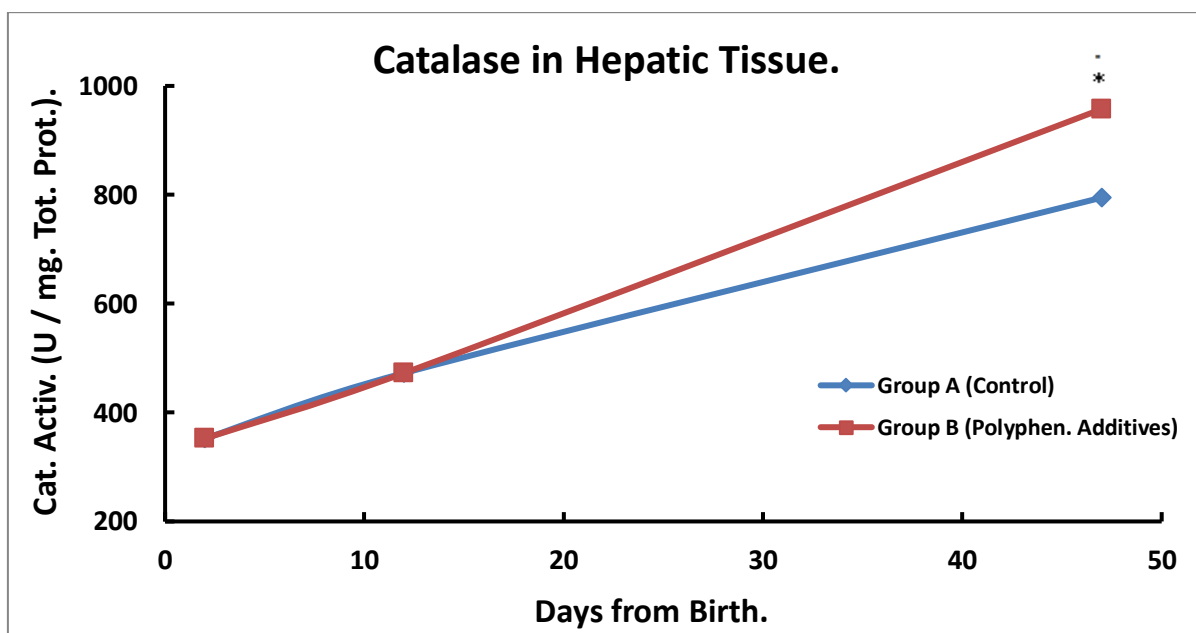
Διάγραμμα 6 GSH στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.

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

Η Β ομάδα (Πολυφαινολικά πρόσθετα) στην τελευταία αιμοληψία (γουρούνια 47 ημερών και μέσου βάρους 12,5 kgr), παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 23,3%, και κατά 32% στον ηπατικό ιστό.

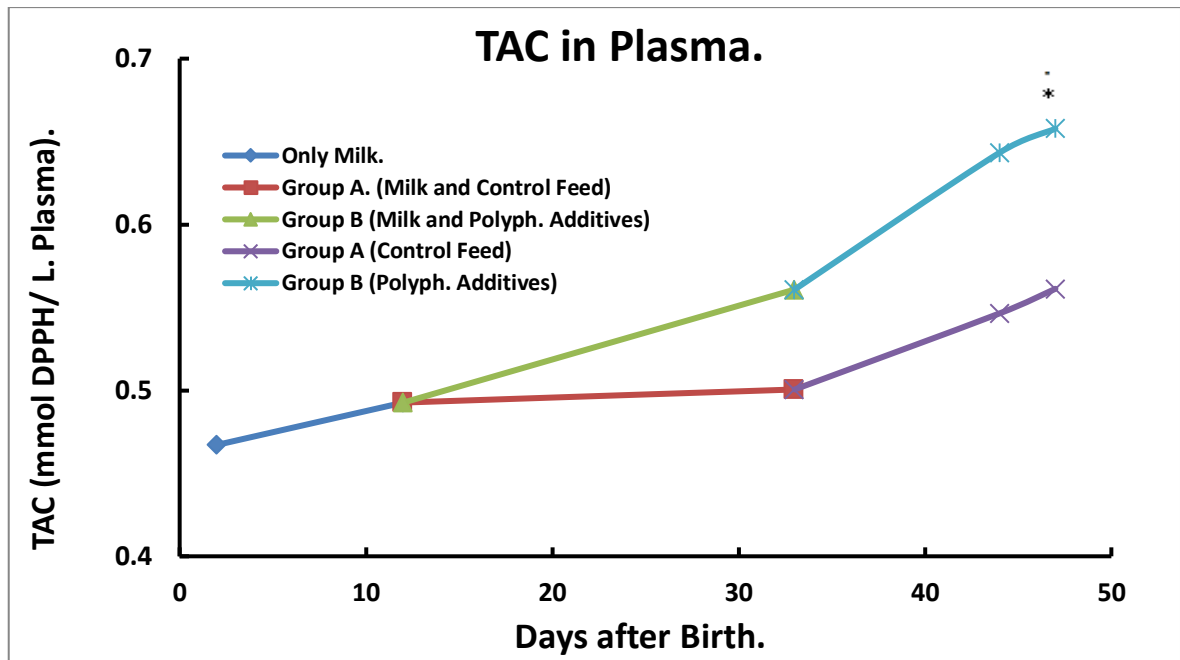


Διάγραμμα 7 Καταλάση στο Αιμόλυμα των Χοίρων (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

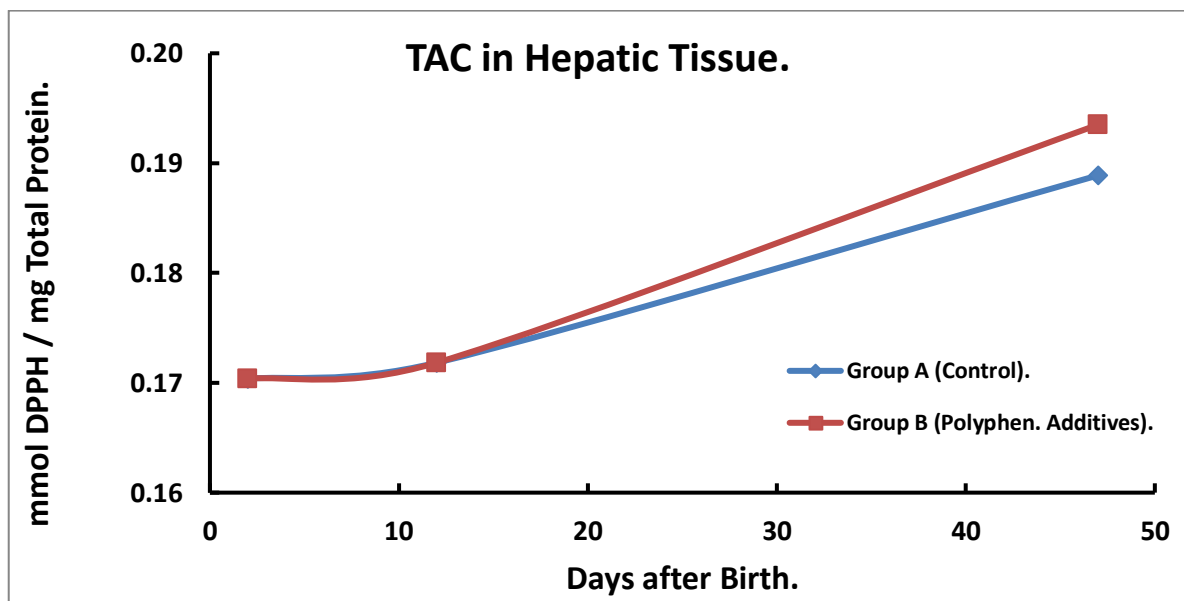


Διάγραμμα 8 Καταλάση στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία αιμοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές δραστηριότητας της Καταλάσης, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 25% και κατά 20% στον ηπατικό ιστό.

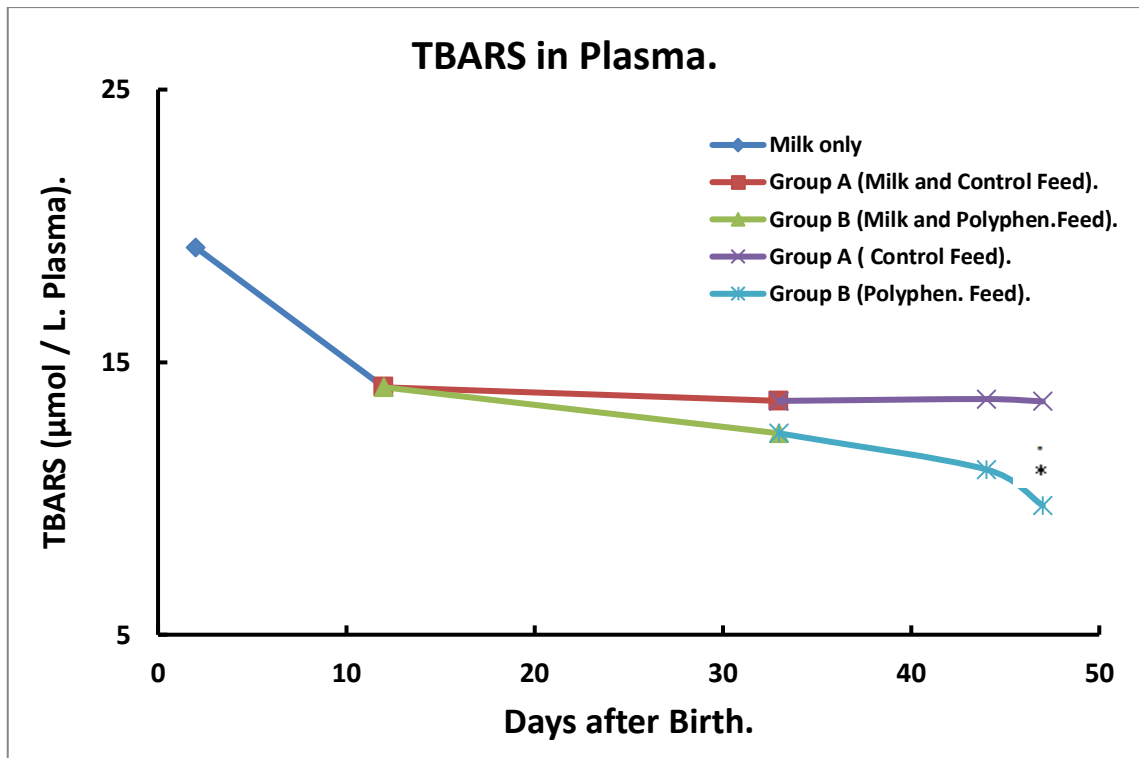


Διάγραμμα 9 TAC στο Πλάσμα των Χοίρων (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά Αιμοληψία).

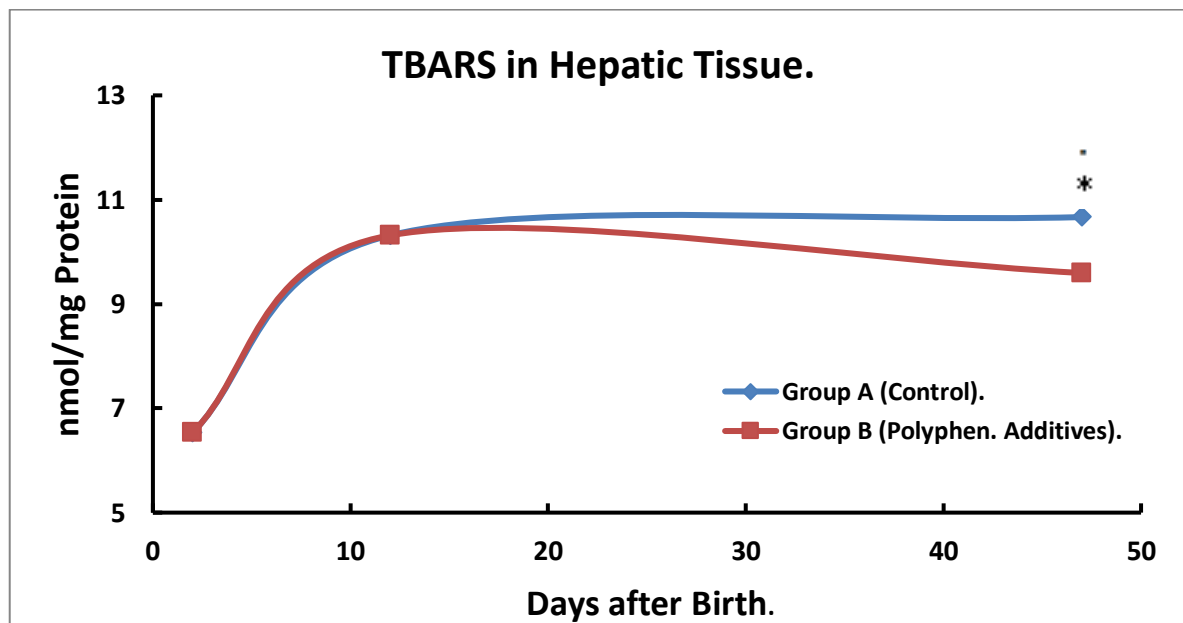


Διάγραμμα 10 TAC στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία αιμοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές TAC, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 17%, ενώ στον ηπατικό ιστό παρατηρείται μια αύξηση 2,5% που, όμως, δε θεωρείται στατιστικά σημαντική.

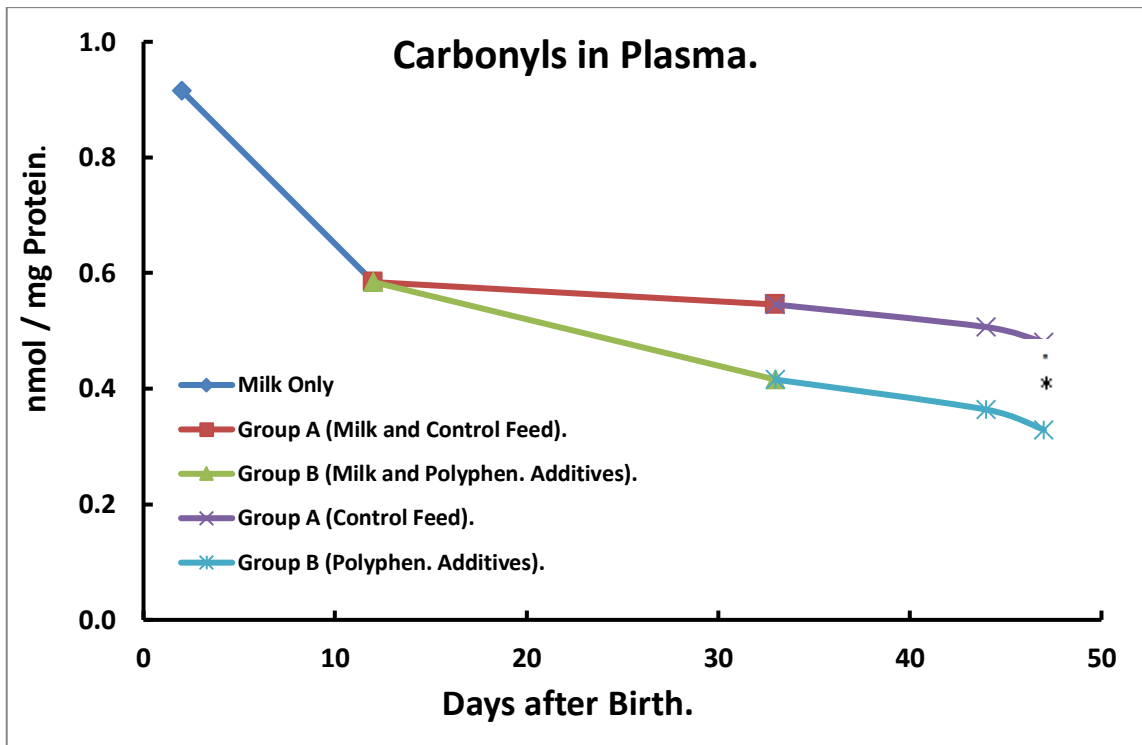


Διάγραμμα 11 TBARS στο Πλάσμα των Χοίρων.

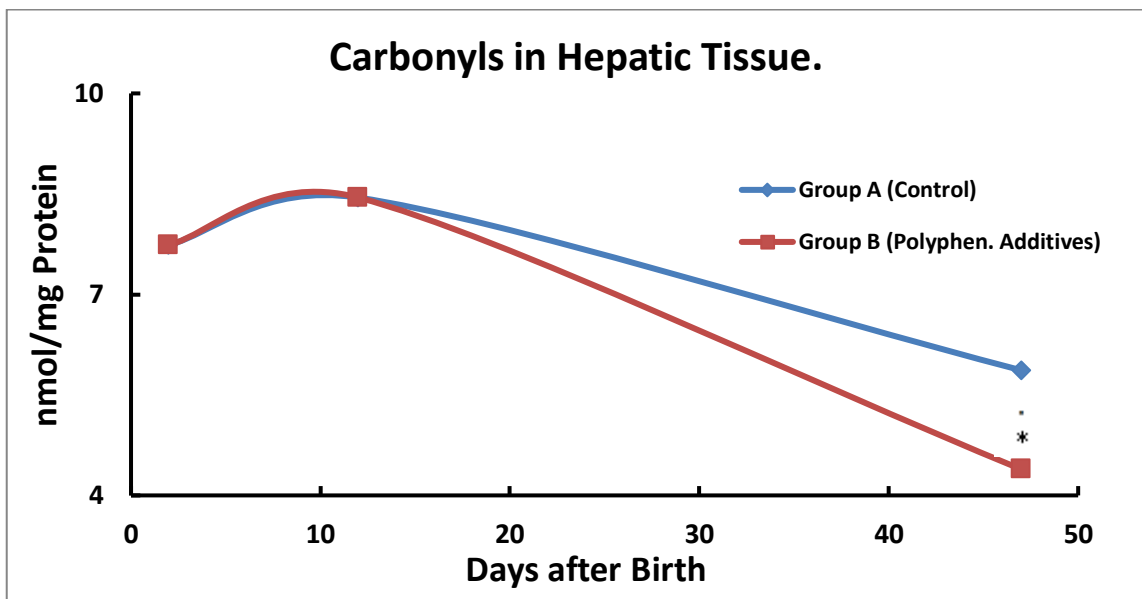


Διάγραμμα 12 TBARS στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία αιμοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές TBARS, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 39%, ενώ κατά 11% στον ηπατικό ιστό.



Διάγραμμα 13 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο Πλάσμα των Χοίρων.



Διάγραμμα 14 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ηπατικό Ιστό των Χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία αιμοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές Καρβονυλίων, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 18%, ενώ κατά 33% στον ηπατικό ιστό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτραφούν έντεκα (11) χοίροι, να διαχωριστούν σε δύο (2) ομάδες και να τρέφονται με δύο (2) διαφορετικά σιτηρέσια ανάλογα της ομάδας στην οποία ανήκουν, με στόχο τον έλεγχο των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο αίμα και στον ηπατικό ιστό. Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν εντοπίστηκε μόνον η συμπεριφορά των δεικτών σε σχέση με το χρόνο, αλλά και αυτή μεταξύ των ομάδων (ομάδα ελέγχου και ομάδα πολυφαινολών) στο αίμα και στον ηπατικό ιστό.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Εκτελέστηκαν πέντε (5) αιμοληψίες: δύο (2), δώδεκα (12), τριάντα τρεις (33), σαράντα τέσσερις (44) και σαράντα οχτώ (48) ημέρες από τη γέννηση των χοίρων, ενώ οι λήψεις ηπατικού ιστού πραγματοποιήθηκαν σε τρία (3) χρονικά διαστήματα: δύο (2), δώδεκα (12) και σαράντα οχτώ (48) ημέρες από τη γέννηση των χοιριδίων. Πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι και τη δέκατη τρίτη (13) ημέρα από τη γέννηση, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τριακοστή (30) μέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε μετά την τριακοστή τρίτη (33) ημέρα από τη γέννηση τους.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, καταλήγουμε στις παρακάτω παρατηρήσεις και συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αιμόλυμα, παρατηρείται μια αύξηση στις τιμές της από την ημέρα του απογαλακτισμού μέχρι την τεσσαρακοστή όγδοη (48) ημέρα και στις δύο (2) ομάδες. Η πολυφαινολική όμως ομάδα, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (4,4 $\mu\text{mol/gr.Hb.}$), η οποία είναι αυξημένη και στατιστικά σημαντική σε σχέση με την τιμή της ομάδας ελέγχου κατά 23,3 %. Το ίδιο ισχύει και στον ηπατικό ιστό, με τη διαφορά ότι εδώ παρατηρείται αύξηση κατά 32%.

Η δραστηριότητα της καταλάσης στο αιμόλυμα, αυξάνεται με υψηλούς ρυθμούς στις πρώτες δεκατέσσερις (14) ημέρες. Από εκεί και μέχρι την τριακοστή τρίτη (33) ημέρα παρουσιάζεται αύξηση, αλλά με χαμηλότερο ρυθμό. Από την τριακοστή τρίτη (33) ημέρα, που έχουμε και τον πλήρη απογαλακτισμό και μετά, παρατηρείται πάλι μεγάλη αύξηση στη δραστηριότητα της καταλάσης στην πολυφαινολική ομάδα, με μέγιστη τιμή 305,8 U/mg. Hb, στατιστικά σημαντική με την τιμή της ομάδας ελέγχου αυξημένη κατά 25%. Παρομοίως, η δραστηριότητα της καταλάσης στον ηπατικό ιστό παρουσιάζεται αυξημένη στην πολυφαινολική ομάδα, σε σχέση με την ομάδα

ελέγχου κατά 20%. Αυτό σημαίνει πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα, υποβοηθούν στην δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Οι τιμές των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ερμηνεύονται ως εξής: Μέχρι τη δέκατη τρίτη (13) ημέρα, οι δυο ομάδες δεν παρουσίασαν διαφορές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Από αυτή τη μέρα και μετά, παρουσιάζεται μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων γίνεται περισσότερο εμφανής μετά τον πλήρη απογαλακτισμό, σε ποσοστό 17% και με υψηλότερη τιμή 0,67 mmol DPPH/L.plasma. Όσον αφορά τον ηπατικό ιστό, παρατηρείται μια παρόμοια αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία, όμως, δεν είναι στατιστικά σημαντική. Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως οι πολυφαινόλες που λαμβάνονται από την αντίστοιχη ομάδα, υποβοηθούν στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Όσον αφορά τις ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρατηρείται μια σημαντική μείωση στις τιμές TBARS από τη γέννηση των χοίρων μέχρι τη δέκατη τρίτη μέρα (13). Αυτή η μείωση συνεχίζει και για τις δύο ομάδες και μετά, με τη μεγαλύτερη να σημειώνεται στην ομάδα με το πολυφαινολικό σιτηρέσιο στην περίοδο του πλήρους απογαλακτισμού (13.6 $\mu\text{mol/mg.protein}$). Αυτό σημαίνει πως η παρουσία των πολυφαινολών, δρα αντιοξειδωτικά και έτσι συνεισφέρει στη μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Παρομοίως, οι τιμές TBARS είναι στατιστικά σημαντικές μειωμένες στην ομάδα B σε σχέση με την A ομάδα (Control), κατά 11% στον ηπατικό ιστό.

Τέλος, μελετήθηκε και η οξείδωση των πρωτεϊνών. Η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την ομάδα B, ενώ η τελευταία μειώνει συνεχώς την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, το οποίο σημαίνει πως οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε αυτήν την ομάδα υποβοηθούν στη μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα στο σιτηρέσιο των χοίρων κρεατοπαραγωγής, δρουν ως αντιοξειδωτικά διότι, για παράδειγμα, η ομάδα B σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά την τελευταία αιμοληψία αυξάνει την τιμή της TAC κατά 17% και παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές μειωμένες συγκεντρώσεις στην οξείδωση των πρωτεϊνών κατά 18% και κατά 33% στον ηπατικό ιστό, των λιπιδίων κατά 39% και κατά 11% στον ηπατικό ιστό, αλλά και αυξημένη δραστηριότητα της καταλάσης κατά 25% και κατά 20% στον ηπατικό ιστό. Τέλος, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως ενδογενές αντιοξειδωτικό, εμφανίζει αύξηση στην ομάδα B στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που σημαίνει ότι στα χοιρίδια η χορήγηση πολυφαινολικού σιτηρεσίου αυξάνει την αντιοξειδωτική

άμυνα του οργανισμού. Η χρήση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ απέδειξαν την αντιοξειδωτική τους δράση, πάνω σε χοίρους κρεατοπαραγωγής σε νεαρή ηλικία.

Ένα άλλο σπουδαίο όμως κεφάλαιο που πρέπει να επισημανθεί είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια ρυπαντική παράμετρο, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των Υ.Α.Ε. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσής των πολυφαινολών, τότε τα απόβλητα ελαιοτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παράδειγμα στην ενσίρωση για τα οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Αντίστοιχα, εφόσον απομονωθούν οι πολυφαινόλες και εκτιμηθούν οι αντιοξειδωτικές ικανότητές τους, θα μπορούσε να προκύψει ένα προϊόν με αυξημένη προστιθέμενη αξία.

Για τη διεξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων προτείνεται η συνέχιση της έρευνας σε μεγαλύτερο αριθμό χοίρων, αλλά και η παρακολούθηση της μελλοντικής χοιρομητέρας για την απόκτηση δεδομένων για την F2 γενιά.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984) **Catalase in vitro**. *Methods Enzymol.* 105, 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,
- Aqil F., Gupta A., Munagala R., Jeyabalan J., Kausar H., Sharma R. J., Singh I. P. and Gupta R. C. (2012) **Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts From Syzygium cumini L. (Jamun, the Indian Blackberry)** *Nutrition and Cancer*, **64**(3): 428–438
- Alexander D. D., Cushing C. A. (2009). **Quantitative assessment of red meat or processed meat consumption and kidney cancer**. *Cancer Detection and Prevention* **32**: 340–351
- Arab L. (2010) **Epidemiologic Evidence on Coffee and Cancer** *Nutrition and Cancer*, **62**(3): 271–283
- Arcidiacono B., Iiritano S., Nocera A., Possidente K., Nevolo M. T., Ventura V., Foti D., Chiefari E., and Brunetti A. (2012) **Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms** *Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research* pp. 1-12
- Baliga M. S., Haniadka R., Pereira M. M., D’Souza J. J., Pallaty P. L., Bhat H. P. and Popuri S. (2011) **Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and its Phytochemicals** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**:499–523
- Banerjee S., Panda C. K. and Das S. (2006) **Clove (Syzygium aromaticum L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer** *Carcinogenesis* **27**(8):1645–1654
- 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 Biochem Biophys* **55**:1–23
- Bidinotto L., López de Cicco R., Vanegas J. E., Santucci- Pereira J., Vanden Heuvel J. P., Washington S., Aliaga C., Xu H., Russo I. H., Manni A., El-Bayoumy K. and Russo J. (2012) **Fish Oil Alters Tamoxifen-Modulated Expression of mRNAs That Encode Genes Related to Differentiation, Proliferation, Metastasis, and Immune Response in Rat Mammary Tumors** *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 991–999
- Boon E M, Downs A and Marcey D. (2007) **Proposed Mechanism of Catalase In Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase**. *Catalase Structural Tutorial Text*.
- Bosetti C., Pelucchi C. and La Vecchia C. (2009) **Diet and cancer in Mediterranean countries:**

carbohydrates and fats *Public Health Nutrition*: **12**(9A): 1595–1600

Boubaker J., Wissem B., Mohammed B. S., Ines B., Mounira K., Ines S., Genviève D. F. M., Kamel G. and Leila C. D. (2012) **Flavonoids Products from *Nitraria retusa* Leaves Promote Lymphoblastoid Cells Apoptosis**. *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 1095–1102

Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R. and Karaca B. (2012) **Effects of *Thymus serpyllum* Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1245–1250

Bravo L. (1998). **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance**, *Nutr Rev*, **56**, (11): 317-33.

Brownell K. D. and Warner K. E. (2009) **The Perils of Ignoring History: Big Tobacco Played Dirty and Millions Died. How Similar Is Big Food?** *The Milbank Quarterly*, **87**(1):259–294

Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. (2011). **The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial**. *Clinical Nutrition*, **30** (4), pp. 490-493.

Cicerale S., Conlan X. A., Sinclair A. J. and Keast R. S. J.(2009) **Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics** *Critical Reviews in Food Science*

and Nutrition, **49**:218–236

Chang K. T., Lampe J. W., Schwartz Y., Breymeyer K. L., Noar K. A., Song X., Neuhouser M. L. (2012) **Low Glycemic Load Experimental Diet More Satiating Than High Glycemic Load Diet** *Nutrition and Cancer*, **64**(5): 666-673

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004) **Diversity of structures and properties among catalases**. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61** (2), pp. 192-208.

Chen Q. and Ross A. C. (2012) **All-Trans-Retinoic Acid and the Glycolipid α -Galactosylceramide Combined Reduce Breast Tumor Growth and Lung Metastasis in a 4T1 Murine Breast Tumor Model** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1219–1227

Christensen K. Y., Naidu A., Parent m. E., Pintos J., Abrahamowicz M., Siemiatycki J. and Koushik A. (2012) **The Risk of Lung Cancer Related to Dietary Intake of Flavonoids**. *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 964–974

Chrupek M., Siipi H., Martinelli L. (2012) **Bio-objects as “boundary crawlers:” the case of microRNAs** *Croat Med J.* **53**:285-8

Cooke M. S., Evans m. D., Dizdaroglu M. and lunec J. (2003) **Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease** *FASEB J.* **17**: 1195–1214

Couto E., Sandin S., Lo M., Ursin G., Adami H.-

O., and Weiderpass E. (2013) **Mediterranean Dietary Pattern and Risk of Breast Cancer** *PLoS ONE* **8**(2): e55374 pp.1-11

De Stefani E., Deneo-Pellegrini H., Ronco A. L., Boffetta P., Correa P., Aune D., Mendilaharsu M., Acosta G., Silva C., Landó G. and Luaces M. E. (2012) **Meat Consumption, Cooking Methods, Mutagens, and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: A Case-Control Study in Uruguay** *Nutrition and Cancer*, **64**(2): 294–299

Dew T., Day A., Morgan M. (2005). **Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.** *Department of Food Science, University of Leeds.*

Djuric Z. (2011) **The Mediterranean diet: Effects on proteins that mediate fatty acid metabolism in the colon** *Nutr Rev.* **69**(12): 730–744

Framstad T., Sjaastad Ø. and Aass R. A. (1988). **Bleeding and intravenous Techniques In Pigs.** *Norwegian School of Veterinary Science and Norwegian Independent meat Association*, **100** (4): 265-272.

Fujisawa S., Atsumi T., Ishihara M and Kadoma Y. (2004) **Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds** *Anticancer research* **24**: 563-570

Giaginis C. and Theocharis s. (2011) **Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios**

Mastic Gum *Nutrition and Cancer*, **63**(8): 1174–1184

Gill A., Ortega R. M. and Maldonado J. (2011) **Wholegrain cereals and bread: a duet of the Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases** *Public Health Nutrition*: **14**(12A): 2316–2322

Giacosa A., Barale R., Bavaresco L., Gatenbyl P., Gerbi V., Janssens J., Johnston B., Kas K., La Vecchia C., Mainguet P., Morazzoni P., Negri E., Pelucchi C., Pezzotti M. and Rondanelli M. (2013) **Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice** *European Journal of Cancer Prevention* **22**:90–95

Gkoutosidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. (2011). **Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment.** **30**(1-3), pp237-246.

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

Hamizah S., Roslida A. H., Fezah O., Tan K.L., Tor Y.S., Tan C.I. (2012) **Chemopreventive Potential of *Annona Muricata* L Leaves on Chemically-Induced Skin Papillomagenesis in Mice** *Asian Pacific J Cancer Prev*, **13**: 2533-2539

Janaszewska, A. and Bartosz, G. (2002) **Assay of total antioxidant capacity: comparison of four**

methods as applied to human blood plasma.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. **62**: 231–236.

Jones P. A. (1986) **DNA Methylation and Cancer** *Cancer Res* **46**: 461-466

Ibibebe T. I., Hughes M. C., Nagle C. M., Bain C. J., Whiteman D. C. and Webb P. M. (2013) **Dietary antioxidants and risk of Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus in an Australian population** *Int. J. Cancer: 00, 000–000 VC*

Inoue M. and Tsugane S. (2012) **Insulin resistance and cancer: epidemiological evidence** *Endocrine-Related Cancer* **19**: 1–8

Karpi J., Kurl S., Laukkanen J. A. and Kauhanen J. (2012) **Serum β -Carotene in Relation to Risk of Prostate Cancer: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study** *Nutrition and Cancer*, **64**(3): 361–367

Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. (2001). **Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF Malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis.** *Can J Neurol Sci.* **28**: 141-143.

Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spiegelhalder B., Bartsch H., Owen R. W. (2003) **Consumption of Argan Oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects** *European Journal of Cancer*

Prevention **12**:67-75

Kiani F., Knutsen S., Singh P., Ursin G., Fraser G. (2006) **Dietary risk factors for ovarian cancer: the Adventist Health Study (United States)** *Cancer Causes and Control* **17**:137–146

Klein E. A., Thompson I. M., Tangen C. M., Crowley J. J., Lucia M. S., Goodman P. J. Minasian L. M., Ford L. G., Parnes H. J., Gaziano J. M., Karp D. D., Lieber M. M., Walther P. J., Klotz L., Parsons J. K., Chin J. L., Darke A. K., Lippman S. M., Goodman G. E., Meyskens F. L., Baker L. H. (2011) **Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)** *JAMA* **306**(14):1549-1556

Kloetzel M., Ehlers A., Niemann B., Buhrke T. and Lampen A. (2013) **Trans Fatty Acids Affect Cellular Viability of Human Intestinal Caco-2 Cells and Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptors** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 139–146

Kontou N., Psaltopoulou T., Soupos N., Polychronopoulos E., Linos A., Xinopoulos D. and Panagiotakos D. B. (2012) **The role of number of meals, coffee intake, salt and type of cookware on colorectal cancer development in the context of the Mediterranean diet Public Health** *Nutrition: pp.* 1-8

Kumar M., Sharma V. L., Sehgal A., and Jain M. (2012) **Protective Effects of Green and White Tea Against Benzo(a)pyrene Induced Oxidative**

Stress and DNA Damage in Murine Model. *Nutrition and Cancer*, **64**(2): 300–306

Kushi L. H., Doyle C., McCullough M., Rock C. L., Demark-Wahnefried W., Bandera E. V., Gapstur S., Patel A. V., Andrews K., Gansler T., and The American Cancer Society (2012) **Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee 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 Cancer J Clin* **62**:30–67.

La Vecchia C. (2009) **Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk** *Nutrition Reviews* **67**(Suppl. 1):126–129

La Vecchia C. (2004) **Mediterranean Diet and Cancer** *Public Health Nutrition*: 7(7): 965–68

Lee I. M., Cook N. R., Gaziano J. M., Gordon D., Ridker P. M., Manson J. E., Hennekens C. H., Buring J. E. (2005) **Vitamin E in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer The Women’s Health Study: A Randomized Controlled Trial** *JAMA*. **294** (5):56–65

Li Y. and Tollefsbol T. O. (2010) **Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components** *Curr Med Chem*. **17**(20): 2141–2151.

Lin Y. and Cai L. (2012) **Environmental and Dietary Factors and Lung Cancer Risk Among Chinese Women: A Case-Control Study in Southeast China** *Nutrition and Cancer*, **64**(4):

508–514

Long H., Yang H., Lin Y., Situ D. and Liu W. (2013) **Fish Oil- Supplemented Parenteral Nutrition in Patients Following Esophageal Cancer Surgery: Effect on Inflammation and Immune Function** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 71–75

Lye A. D. and Hayslip J. W. (2012). **Immunonutrition: Does It Have a Role in Improving Recovery in Patients Receiving a Stem Cell Transplant?** *Nutrition and Cancer*, **64**(4): 503–507

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 phanerochaeta chrysosporium.** *Grasas y Aceites* 58(4), pp. 366–371.

Mendivil-Perez M., Jimenez-Del-Rio M. and Velez-Pardo C. (2013) **Glucose Starvation Induces Apoptosis in a Model of Acute T Leukemia Dependent on Caspase-3 and Apoptosis-Inducing Factor: A Therapeutic Strategy** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 99–109

Niaounakis, M., Halvadakis C.P. (2006). **Olive Processing Waste Management.** Literature Review and Patent Survey, Second Edition, Elsevier ISBN: 978-0-08-044851-0.

Niclis C., del Pilar Díaz M., Eynard A. R., Román M. D. and La Vecchia C. (2012) **Dietary Habits and Prostate Cancer Prevention: A Review of**

Observational Studies by Focusing on South America *Nutrition and Cancer*, **64**(1): 23–33

Ntougias S., Bourtzis K. and Tsiamis G. (2013). **The Microbiology of Olive Mill Wastes. Review.** *BioMed Research International*.

Ou Y., Jiang B., Wang X., Ma W. and Guo J. (2012) **Selenium and Colorectal Adenomas Risk: A Meta- Analysis** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1153–1159

Ouédraogo M., Charles C., Ouédraogo M., Guissou I. P., Stévigny C. and Duez P. (2011) **An Overview of Cancer Chemopreventive Potential and Safety of Proanthocyanidins** *Nutrition and Cancer*, **63**(8): 1163–1173

Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F.-T., Zhou T.-T., Liu B. and Bao J.-K. (2012) **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis** *Cell Prolif.*, **45**: 487–498

Pal D., Banerjee S., Mukherjee S., Roy A., Panda C. K., Das S. (2010). **Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: Downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway.** *Journal of Dermatological Science* **59**:31–39.

Pani G., Galeotti T. and Chiarugi P. (2010) **Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress** *Cancer Metastasis Rev* **29**:351–378

Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. (2003) **Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification.** *Clin Chim Acta* **333**(1): 19-39.

Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. (2004). **Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene-tetrazol-induced epileptic seizure.** *Neurosci Lett.*, **357**: 83-86.

Pauwels E.K. J. (2011) **The Protective Effect of the Mediterranean Diet: Focus on Cancer and Cardiovascular Risk** *Med Princ Pract.* **20**:103–111

Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F and Scalbert A. (2010). **Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database.** *J. Agric. Food Chem.* **58**, pp.4959-69

Ramnath V., Rekha P. S., Sujatha K. S. (2007). **Amelioration of Heat Stress Induced Disturbances of Antioxidant Defense System in Chicken by Brahma Rasayana.** *Advance Access Publication eCAM* 2008; **5**(1)77–84.

Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. (2004). **Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients.** *Indian J. Tuberc.* **51**, 213–218.

- Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. (1952). **A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase.** *Biol. Chem.* **195**:133-140.
- Ryan, D., Robards, K. (1998). **Phenolic compounds in olives.** *Analyst* **123**(5), pp. 31R-44R.
- Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. (2004) **Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview** *Asian Pacific J Cancer Prev*, **5**: 237-245
- Shafique K., McLoone P., Qureshi K., Leung H., Hart C. and Morrison D. S. (2012) **Tea Consumption and the Risk of Overall and Grade Specific Prostate Cancer: A Large Prospective Cohort Study of Scottish Men.** *Nutrition and Cancer*, **64**(6): 790–797
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. (2008). **Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts.** *Agric. Food Chem.* **56**(16):6967-76.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. (2011). **Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation.** *In Vivo.* **25**(4):657-62.
- Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J. 2007. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *Agric. Food Chem.* **55**(13):5246-52.
- Takata Y., Xiang Y. B., Yang G., Li H., Gao J., Cai H., Gao Y. T., Zheng W. and Shu X. O. (2013) **Intakes of Fruits, Vegetables, and Related Vitamins and Lung Cancer Risk: Results from the Shanghai Men's Health Study (2002–2009)** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 51–61
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. (1992). **Phenolic compounds and stability of virgin olive oil.** *Food Chemistry* **45** (2), pp. 141-144.
- Vainio H. (1999) **Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story** *British Medical Bulletin* **55** (3): 593-599
- Vaya, J., Aviram M. (2001). **Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications.** *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, **19**(1), pp. 99-117.
- Verma A. and Shukla G. (2013) **Probiotics Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus Suppresses DMH-Induced Procarcinogenic Fecal Enzymes and Preneoplastic Aberrant Crypt Foci in Early Colon Carcinogenesis in Sprague Dawley Rats** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 84–91

Wang Z. H., Gao Q. Y. and Fang J. Y. (2012) **Green Tea and Incidence of Colorectal Cancer: Evidence from Prospective Cohort Studies.** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1143–1152

Weisburger J. H. (2001) **Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases** *Experimental Biology and Medicine* **226**:891-897.

Wells P. G., McCallum G. P., Chen C. S., Henderson J. T., Lee C. J. J., Perstin J., Preston T. J., Wiley M. J. and Wong A. W. (2009) **Oxidative**

Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer *Toxicological Sciences* **108**(1): 4–18.

Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. (2009). **Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus.** *Antiviral Res.* **83**(1):35-44.