



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

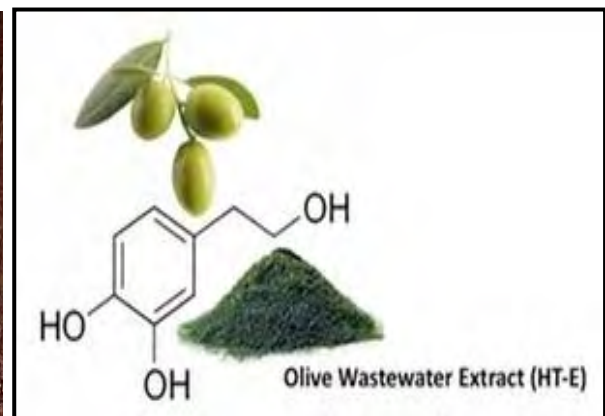
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΚΑΡΔΙΑΚΟ, ΝΕΦΡΙΚΟ, ΜΥΪΚΟ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟ ΙΣΤΟ ΑΠΟ
ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΔΙΑ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGG'S
CARDIAC, KIDNEY, QUADRICEPS AND LUNG TISSUE
TREATED WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES
IN THE ABLACTATION PERIOD



ΚΑΡΑΒΕΛΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, εκπονήθηκε στα εργαστήρια: Φυσιολογίας Ζωικών 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, Κωνσταντίνο Γερασόπουλο που συνέβαλε τα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	<u>ΣΕΛΙΔΑ</u>
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.	2
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	9
1.1. Πολυφαινόλες.	10
1.1.1. Ετυμολογία.	10
1.1.2. Ορισμός.	10
1.1.3. Ιστορικό.	10
1.1.4. Φυσικές Ιδιότητες.	13
1.1.5. Φυτικές Πολυφαινόλες-Κατηγορίες.	13
1.2. Οξειδωτικό Στρες.	15
1.2.1. Ιστορική Αναδρομή.	15
1.2.2. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ).	16
1.2.3. Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.	18
1.2.4. Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.	20
1.2.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.	22
1.3. Σκοπός.	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	24
2.1. Γενικά.	24
2.2. Περιγραφή Σιτηρεσίου.	27
2.3. Ομογενοποίηση Ιστών.	29
2.4. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στους Ιστούς.	30
2.4.1. Γενικά.	30
2.4.2. Μέθοδοι.	30
2.4.2.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)	30
2.4.2.1.1. Αρχή της Μεθόδου.	31
2.4.2.1.2. Αντιδραστήρια.	32
2.4.2.1.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.	32
2.4.2.1.4. Υπολογισμοί.	33
2.4.2.2. Δραστηριότητα Καταλάσης.	34
2.4.2.2.1. Αρχή της Μεθόδου.	34

2.4.2.2.2. Αντιδραστήρια.	35
2.4.2.2.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.	36
2.4.2.2.4. Υπολογισμοί.	36
2.4.2.3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)	37
2.4.2.3.1. Αρχή της Μεθόδου.	37
2.4.2.3.2. Αντιδραστήρια.	37
2.4.2.3.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.	38
2.4.2.3.4. Υπολογισμοί.	39
2.4.2.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	39
2.4.2.4.1. Αρχή της Μεθόδου.	39
2.4.2.4.2. Αντιδραστήρια.	40
2.4.2.4.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.	41
2.4.2.4.4. Υπολογισμοί.	41
2.4.2.5. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.	42
2.4.2.5.1. Αρχή της Μεθόδου.	42
2.4.2.5.2. Αντιδραστήρια.	43
2.4.2.5.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.	44
2.4.2.5.4. Υπολογισμοί.	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	46
3.1. Αποτελέσματα Μέτρησης Γλουταθειόνης (GSH).	46
3.2. Αποτελέσματα Μέτρησης Δραστηριότητας της Καταλάσης (CAT).	49
3.3. Αποτελέσματα Μέτρησης της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).	51
3.4. Αποτελέσματα Μέτρησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).	53
3.5. Αποτελέσματα Μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.	55
3.6. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Μετρήσεων.	58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	62

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.	Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ.	14
Πίνακας 2.	Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού ομάδας Α (ελέγχου).	27
Πίνακας 3.	Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας (Β) με Πολυφαινολικά Πρόσθετα.	27
Πίνακας 4.	Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.	32
Πίνακας 5.	Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων, για την Μέτρηση της Καταλάσης.	36
Πίνακας 6.	Διαδοχική σειρά Προσθήκης και Ποσότητες των Αντιδραστηρίων, για την Μέτρηση της TAC.	38

Κατάλογος Εικόνων.

Εικόνα 1.	Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη.	13
Εικόνα 2.	Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των πολυφαινολών και της υποδιαίρεσης τους στις τέσσερις (4) κύριες κατηγορίες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνίνες.	15
Εικόνα 3.	Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων.	19
Εικόνα 4.	Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.	20
Εικόνα 5.	Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.	23
Εικόνα 6.	Ασθένειες που οφείλονται στα ROS.	24
Εικόνα 7.	Οι Χώροι Εγκατάστασης Στις Οποίες Εκτράφηκαν οι Χοίροι Που Συμμετείχαν Στην Παρούσα Μελέτη.	28
Εικόνα 8.	Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσκευή Αποσυμπίεσης.	29
Εικόνα 9.	Τα Εργαλεία Που Χρησιμοποιήθηκαν Για Την Ομογενοποίηση Ιστών.	30
Εικόνα 10.	Συντακτικός Τύπος της Γλουταθειόνης.	31

Εικόνα 11.	Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.	35
Εικόνα 12.	Μονοπάτι Αναγωγής του H ₂ O ₂ σε H ₂ O.	40
Εικόνα 13.	Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην Παραγωγή του Μορίου TBA-MDA.	43
Εικόνα 14.	Σύνδεση Πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλυδραζίνη) και Σχηματισμός του Δίνιτροφαινυλυδραζονίου.	33

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1.	Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου Από Τη Μέρα Της Γέννησης Μέχρι Τη Θανάτωση Τους.	25
Διάγραμμα 2.	Αύξηση Στα Βάρη Των Χοίρων Σε Σχέση Με Το Χρόνο.	25
Διάγραμμα 3.	Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων.	28
Διάγραμμα 4.	GSH στον καρδιακό ιστό των χοίρων.	46
Διάγραμμα 5.	GSH στο νεφρικό ιστό των χοίρων.	47
Διάγραμμα 6.	GSH στο μυϊκό ιστό των χοίρων.	47
Διάγραμμα 7.	GSH στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.	48
Διάγραμμα 8.	Catalase στον καρδιακό ιστό των χοίρων.	49
Διάγραμμα 9.	Catalase στο νεφρικό ιστό των χοίρων.	49
Διάγραμμα 10.	Catalase στο μυϊκό ιστό των χοίρων.	50
Διάγραμμα 11.	Catalase στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.	50
Διάγραμμα 12.	TAC στον καρδιακό ιστό των χοίρων.	51
Διάγραμμα 13.	TAC στο νεφρικό ιστό των χοίρων.	52
Διάγραμμα 14.	TAC στον μυϊκό ιστό των χοίρων.	52
Διάγραμμα 15.	TAC στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.	53
Διάγραμμα 16.	TBARS στον καρδιακό ιστό των χοίρων.	53
Διάγραμμα 17.	TBARS στο νεφρικό ιστό των χοίρων.	54
Διάγραμμα 18.	TBARS στο μυϊκό ιστό των χοίρων.	54
Διάγραμμα 19.	TBARS στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.	55

Διάγραμμα 20.	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον καρδιακό ιστό των χοίρων.	56
Διάγραμμα 21.	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο νεφρικό ιστό των χοίρων.	56
Διάγραμμα 22.	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον μυϊκό ιστό των χοίρων.	57
Διάγραμμα 23.	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.	57
Διάγραμμα 24.	Σύγκριση των Αποτελεσμάτων Μετρήσεων της Πολυφαινολικής ομάδας στους ιστούς των χοίρων.	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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 απόβλητα ελαιοτριβείου), προκειμένου να ελεγχθούν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες σε καρδιακό, νεφρικό, μυϊκό και πνευμονικό 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 διαίτα σε όλο το πείραμα. Η άλλη ομάδα (ομάδα Β-πολυφαινολική ομάδα) ελάμβανε το σιτηρέσιο που περιείχε τα πολυφαινολικά πρόσθετα. Τρείς (3) συλλογές και των τεσσάρων (4) ιστών (καρδιακού, νεφρικού, μυϊκού και πνευμονικού ιστού) από όλους τους χοίρους έγιναν σε δύο (2), δώδεκα (12) και σαράντα επτά (47) ημέρες μετά από τη γέννηση τους. Μέτα τη συλλογή τους οι ιστοί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, ομογενοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν στους -80°C , μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ήταν ικανοποιητικά. Τα πολυφαινολικά πρόσθετα επηρεάζουν τη συμπεριφορά των δεικτών του οξειδωτικού στρες καθώς, η ομάδα που λάμβανε τα πολυφαινολικά πρόσθετα παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στατιστικά σημαντική αύξηση δραστηριότητας παρατηρήθηκε τόσο στη μέτρηση της καταλάσης όσο και στις μετρήσεις της γλουταθειόνης (GSH) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Τέλος, όσον αφορά τα TBARS και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στην πολυφαινολική ομάδα εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές μειώσεις σε όλα τα δείγματα ιστών, 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 νεαρή ηλικία και καθίσταται εφικτή για τη δημιουργία νέων προϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας.

ABSTRACT

The aim of this research was to raise eleven (11) 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 cardiac, kidney, quadriceps and lung tissue using oxidative stress biomarkers. For this reason the young pigs were separated in two (2) groups. The first group (group A) was the control group with the basic diet throughout the experiment, while the other group (group B-polyphenolic group) was receiving special feed with polyphenolic additives.

Three (3) collections of all four (4) tissues (cardiac, kidney, quadriceps and lung tissue) were performed at two (2), twelve (12) and forty seven (47) days after the birth of all the young pigs. After their collection, tissues were transported to the laboratory where they were homogenized and stored at -80°C until their biochemical analysis.

The results of this research showed that the polyphenolic additives affect the biomarkers of oxidative stress, since the group received the polyphenolic additives showed statistically significant differences from those of the control group. Statistically significant increases of activity were shown in the measurements of catalase, glutathione (GSH) and total antioxidant capacity (TAC). Finally, as regards the TBARS and protein carbonyls, there were significant decreases in all polyphenolic tissue samples compared to the control group.

In conclusion, polyphenolic additives from processed OMWW may be used as feed in young pigs for enhancing their antioxidant capacity, and so it may be possible the development of new high-value added products.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η λεκάνη της Μεσογείου είναι η κύρια περιοχή παραγωγής ελαιόλαδου στον κόσμο και η Ελλάδα είναι μια από τις κυριότερες χώρες παραγωγής. Για το λόγο αυτό σήμερα στην Ελλάδα λειτουργούν πάνω από δύο χιλιάδες διακόσιοι (2.200) μύλοι ελαιοτριβείου, η πλειοψηφία των οποίων είναι ένας μύλος φυγοκέντρησης τριών (3) φάσεων. Από αυτό τον τύπο μύλου, ένα από τα κύρια υπό-προϊόντα είναι τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο περιβαλλοντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι έλαιο-παραγωγικές περιοχές (*Agalias Apostolis et. al., 2007*).

Οι οργανικές ενώσεις που βρίσκονται στα ΥΑΕ είναι τα σάκχαρα, οι τανίνες, οι φαινολικές ενώσεις, οι πολύ-αλκοόλες, οι πηκτίνες και τα λιπίδια (*Ahmad A. Deeb et. al., 2012*). Τα ΥΑΕ είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές πολυφαινολικές ενώσεις που επιδεικνύουν αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (*Kalogerakis N. et. al., 2013*).

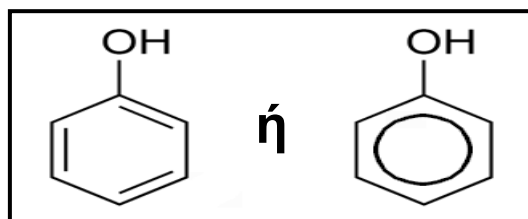
Η υδροξυτυροσώλη είναι μία από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε αφθονία στα ΥΑΕ και είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα από θρεπτική άποψη. Η υδροξυτυροσώλη έχει μελετηθεί ευρέως αποδεικνύοντας τις αντιοξειδωτικές και ευεργετικές ιδιότητες της όπως επίσης και την καλή βιοδιαθεσιμότητα της. Η υδροξυτυροσώλη απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, αναστέλλει την οξειδωση της ανθρώπινης LDL, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και της παραγωγής του λευκοτριενίου για ανθρώπινα ουδετερόφιλα και δείχνει *in vitro* αντιμικροβιακή δράση. (*Ahmad A. Deeb et. al., 2012*).

Για το λόγο αυτό η εκμετάλλευση των πολυφαινολών που περιέχονται στα ΥΑΕ λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη φαρμακευτική και κοσμητική βιομηχανία καθώς επίσης και ως πρόσθετα τροφίμων για τη δημιουργία προϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας (*Agalias Apostolis et. al., 2007*).

Η ύπαρξη διάφορων πολυφαινολών ευθύνεται για το έντονο σκούρο χρώμα και τη χαρακτηριστική μυρωδιά των ΥΑΕ. Όταν απομονώνονται οι πολυφαινόλες από το φορτίο των ΥΑΕ, δημιουργείται ένα προϊόν, το οποίο

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές γεωργικές εφαρμογές, όπως η υδρολίπανση και η ενσίρωση (Gkoutsidis *et. al.*, 2011).

1.1 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.



Εικόνα 1. Φαινολικό οξύ. Η απλούστερη φαινόλη.

1.1.1. Ετυμολογία: Το όνομα τους προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «πολύς» και από τη λέξη φαινόλη η οποία αναφέρεται στη χημική δομή που σχηματίζεται με την προσάρτηση σε έναν αρωματικό βενζοειδή δακτύλιο μιας υδροξυλικής ομάδας (-OH) παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε στις αλκοόλες.

1.1.2. Ορισμός: Ο όρος «πολυφαινόλες» χρησιμοποιείται για να καθορίσει τους φυτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται αποκλειστικά από, τα προερχόμενα από το σικιμικό, τα φαινυλοπροπανοειδή ή/και από την οδό του πολυκετιδίου, τα οποία διαθέτουν παραπάνω από ένα φαινολικό δακτύλιο και στερούνται οποιαδήποτε λειτουργική ομάδα αζώτου στη βασική τους δομή. Ο όρος «πολυφαινόλη» για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε το 1894 (*Stéphane Quideau et.al.*, 2011).

1.1.3. Ιστορικό.

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για να ερευνησει κάποιος τις φυτικές πολυφαινόλες. Από τους βασικούς τύπους δομών τους μέχρι και τη συνεργασία τους για την περαιτέρω χημική τους μετατροπή και τη δημιουργία ολιγό-/πολυμερών συγκροτημάτων, οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα εντυπωσιακό ευρύ φάσμα βιο-/φυσικό-χημικών ιδιοτήτων που τις καθιστά μάλλον μοναδικό και ενδιαφέρον φυσικό προϊόν. Η πρώτη ερώτηση που έρχεται στο μυαλό είναι γιατί τα φυτά επιλέγουν να βασίζονται σε τόσο μεγάλο βαθμό στην παραγωγή μεταβολιτών με πολλαπλές φαινολικές ομάδες. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης

και πιθανότατα είναι διαφορετική ανάλογα με το είδος της πολυφαινόλης. Σε γενικές γραμμές, οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν εμπλακεί σε διάφορους λειτουργικούς ρόλους, συμπεριλαμβανομένης και της αντίστασης των φυτών έναντι παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων ζώων όπως είναι τα έντομα, την προστασία έναντι της ηλιακής ακτινοβολίας (έναντι της UV ακτινοβολίας που καταστρέφει το DNA), καθώς και την αναπαραγωγή, τη διατροφή και την ανάπτυξη, ιδίως μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλων οργανισμών πάνω και κάτω από το έδαφος (έντομα, μύκητες και συμβιωτικά βακτήρια) κατά τη διάρκεια της μακροπρόθεσμης εξέλιξης, καθώς και την υποχρεωτική γρήγορη εποχική προσαρμογή, τα φυτά έχουν μάθει να αντιμετωπίζουν τις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος και τις πιέσεις επικαλούμενα το μεγάλο χημικό τους «οπλοστάσιο» μέσω του εξαιρετικά δυναμικού δευτερογενή μεταβολισμού τους.

Φυσικά ανάμεσα στις κύριες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών, άλλοι, όπως τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή έχουν αποδείξει τη δυνατότητα τους στην προστασία των φυτών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους, συμβάλλοντας παράλληλα με χημικά μέσα για να διατηρήσουν την οικολογική ισορροπία μεταξύ των φυτών και άλλων ζωντανών οργανισμών, πολλοί εκ των οποίων τρέφονται από αυτούς, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Ωστόσο, οι φυτικές φαινόλες είναι ιδιαίτερα σημαντικές λόγω των λειτουργιών που προσφέρουν στα φυτά, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των εγγενών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Αναμφισβήτητο το πιο πολυσυζητημένο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών και γενικότερα των φαινολικών φυτών, είναι η αναγνωρισμένη ικανότητα τους να δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), όπως τις O_2^- , $HO\cdot$, $NO\cdot$, H_2O_2 , όπως επίσης και οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες RO και ROO. Όλα αυτά τα είδη μπορούν να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Αυτή η λεγόμενη αντιοξειδωτική ικανότητα που αναφέρεται συχνά ως η κύρια ιδιότητα τους βασίζεται στην πρόληψη ή/και τη μείωση του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με χρόνιες παθήσεις και διαταραχές που συνδέονται με την ηλικία, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα (για παράδειγμα αποσκλήρυνση), καρκινογένεση, νευροεκφυλισμός (νόσος Alzheimer), μέσω διατροφής πολυφαινολικών φυτών και άλλων εμπορευμάτων που περιέχουν φυτικές πολυφαινόλες. Οι φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν επίσης

να δρουν ως αντιοξειδωτικά με χηλίωση μεταλλικών ιόντων, όπως σιδήρου, χαλκού και σιδήρου και τα ιόντα που εμπλέκονται στην μετατροπή του O₂- και H₂O₂ στο εξαιρετικά επιθετικό HO μέσω αντιδράσεων Haber-Weiss/Fenton. Μπορούν επίσης να εμποδίσουν τη δράση ορισμένων ενζύμων υπεύθυνων για την παραγωγή του O₂ όπως και την οξειδάση της ξανθίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης (*Prof. Stéphane Quideau et.al., 2011*).

Όσον αφορά τα τρόφιμα, οι φαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον από το 1990 λόγω των αυξανόμενων αποδείξεων της ευεργετικής επίδρασης που έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Το ενδιαφέρον διεγείρεται κυρίως από επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες και τη συχνότητα των ασθενειών, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης και ο καρκίνος.

Δεδομένου ότι οι φαινολικές ενώσεις στη διατροφή παρουσιάζουν ισχυρές ιδιότητες απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών ο κύριος ρόλος τους πιστεύεται ότι είναι η ικανότητα τους ως αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται στην προστασία και την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ωστόσο την τελευταία δεκαετία, ο τρόπος δράσης αυτών των ενώσεων έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο περίπλοκος από ότι αρχικά αναμενόταν. Στην πραγματικότητα οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να ασκούν και πολλές άλλες βιολογικές επιδράσεις. Μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου και την πρόσληψη της χοληστερόλης, ρυθμίζουν διαφορετικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της τελομεράσης, της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης, και να αλληλεπιδρούν με διάφορες οδούς της μεταγωγής σήματος. Επίσης οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν κασπασο-εξαρτώμενα μονοπάτια της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της ρύθμισης των αιμοπεταλίων και επίσης είναι σε θέση να αποτρέψουν ενδοθηλιακές δυσλειτουργίες (*Massimo D'Archivio et.al., 2010*).

1.1.4. Φυσικές Ιδιότητες.

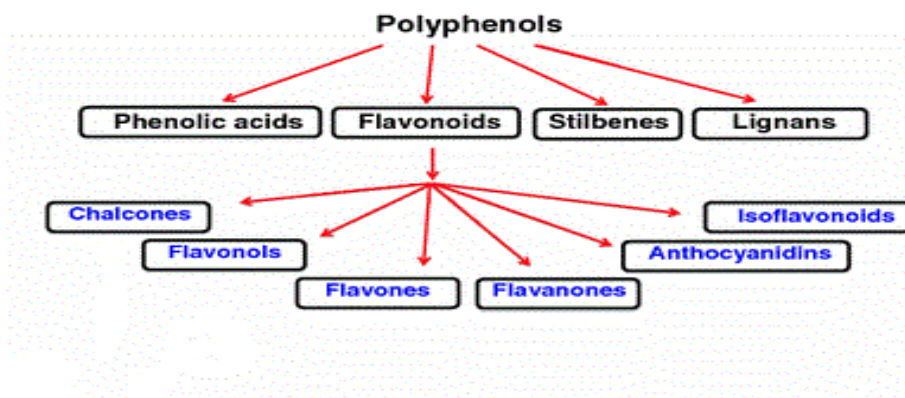
Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

1.1.5. 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*).

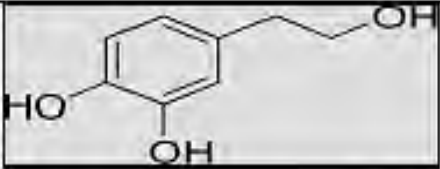
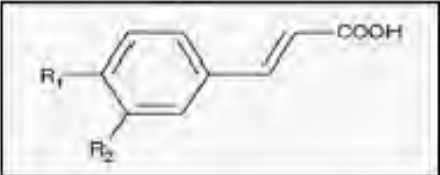
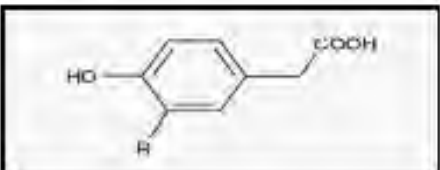


Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των πολυφαινολών και της υποδιαίρεσης τους στις τέσσερις (4) κύριες κατηγορίες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνίνες).

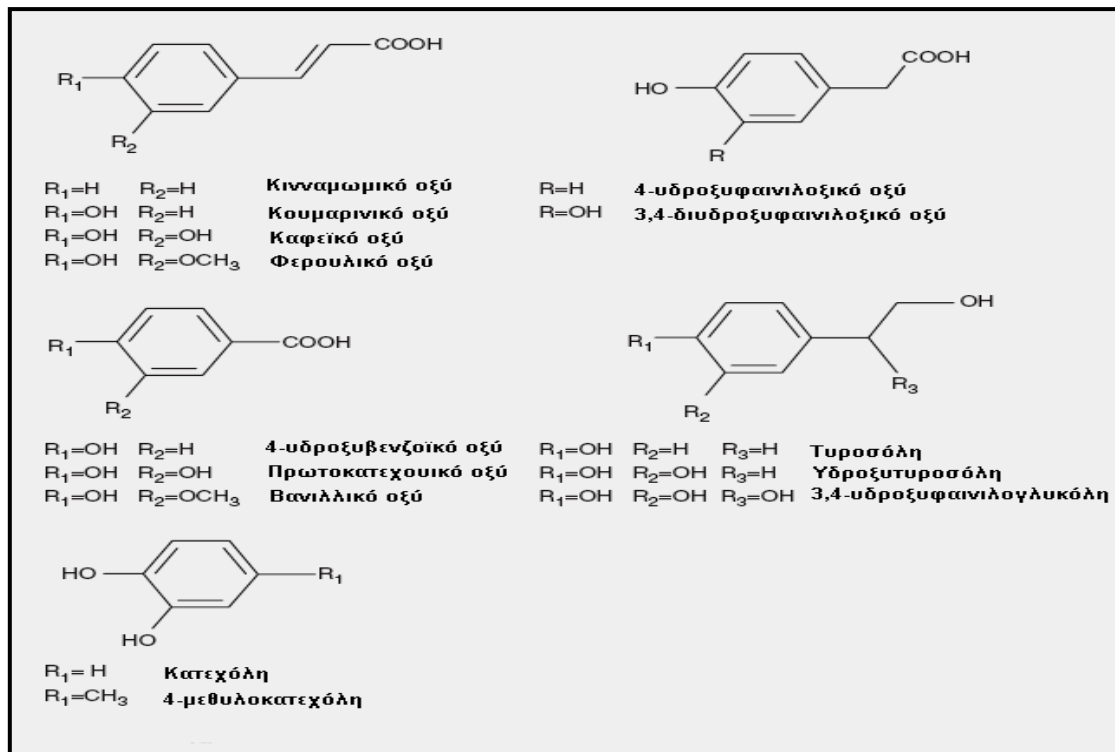
Έχουν αναγνωρισθεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

- Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση.
- Δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών. Συνήθως, δρουν συνεργικά, δηλαδή εμφανίζουν ισχυρότερη δράση όταν συνδυάζονται διαφορετικές κατηγορίες φυτοχημικών.
- Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

α/α	Κατηγορία	Πολυφαινόλες	Χημικοί Τύποι
1	Υ.Α.Ε.	Υδροξυτυροσώλη	
		Καφεϊκό Οξύ	
		Υδροξυφαινολικό Οξύ	

Πίνακας 1. Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ.



Εικόνα 3. Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Niaounnakis & Halvadakis, 2006).

1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

1.2.1. Ιστορική Αναδρομή.

Το 1775 ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί 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 O_2 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.

1.2.2. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ) .

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.

Άτομα 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 $*O_2$. 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.

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species, ROS*) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: **(i) ελεύθερες ρίζες**, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$), **(ii) ιόντα**, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως ($HClO$), **(iii) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων**, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$) και **(iv) μόρια**, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια

ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, κλέβοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (*J. G. Salway et al., 2006*).

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 ($O_2^{\cdot-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^{\cdot}$),
- η ρίζα υπεροξειδίου ($-ROO^{\cdot}$),
- το O_2 απλής κατάστασης,
- το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

1.2.3. Πώς 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; Niclis et al., 2011; Lin and Cai, 2012; Cicerale et al., 2008; Vainio et al., 1999; Wells et al., 2008*). Σε καταστάσεις στρες οι ελεύθερες ρίζες αυξάνονται, προκαλώντας βλάβες στο γενετικό υλικό, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες (*Lee et al., 2005*).

Οι **κυριότεροι φυσιολογικοί μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών** περιλαμβάνουν:

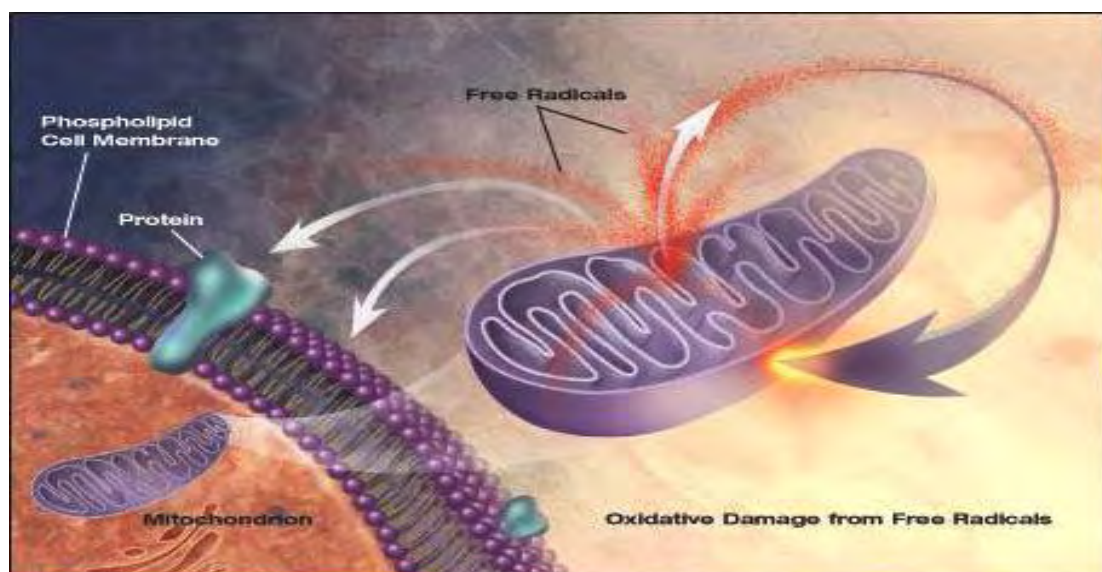
(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των

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*).

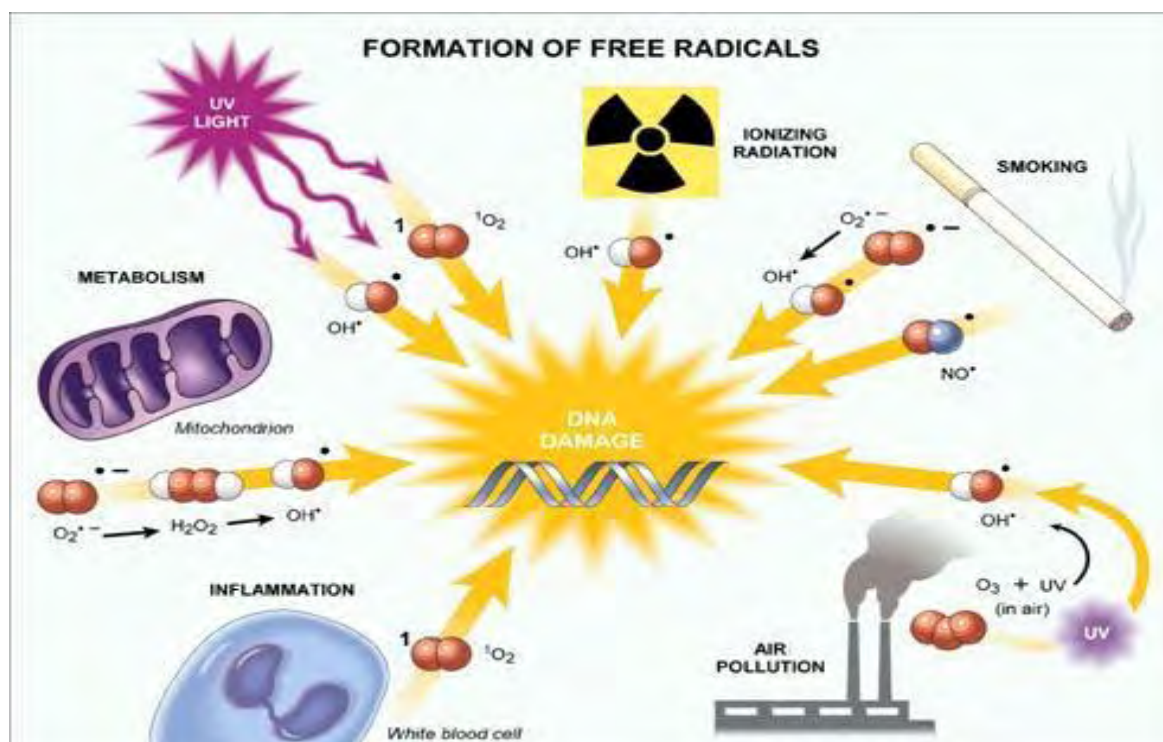
(γ) Την παραγωγή των ιδιαίτερων δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων (*Pani and Galeotti, 2010; Battin et al., 2009; Cooke et al., 2013; AICR, 2007*).

(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 4. 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-Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία) (Battin et al., 2009).



Εικόνα 5. Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

1.2.4. 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 υπεροξείδωση 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.

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).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

(1) 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.

(2) 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.

1.2.5. 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.

Οι ελεύθερες ρίζες ευθύνονται για την πρόκληση και εμφάνιση πολλών ασθενειών, με το κατάλογο αυτών συνεχώς να αυξάνεται (*Haliwell, 2001*).

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται μετά από υπερβολική προσφορά οξυγόνου (για παράδειγμα στους μύες κατά την έντονη άσκηση) ή ακτινοβολία των ιστών (η αλληλεπίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας με μόρια H₂O και O₂ παράγει ελεύθερες ρίζες) και συμβάλλει στην ιστική βλάβη.

Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι προάγγελος της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος του στον τραυματισμό κάποιου ιστού που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας. Αυτό συμβαίνει επειδή η αποκατάσταση της ροής του οξυγόνου, παρ' όλη την αναγκαιότητά της για την επιβίωση του ιστού, οδηγεί στο σχηματισμό ROS. Ο καπνός του τσιγάρου, με τα διάφορα εποξειδία και υπεροξειδία που περιέχει, καθώς και η εισπνοή ανόργανων σωματιδίων όπως η άσβεστος προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων. Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, όπως καρκίνου, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας,

διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου Χ χρωμοσώματος. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κρύβεται πίσω από το σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως (B.N. Ames et al., 1993, Cooke et al., 2003),).



Εικόνα 6. Ασθένειες που οφείλονται στα ROS.

1.3. 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 στον καρδιακό, νεφρικό, μυϊκό και πνευμονικό ιστό, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί αν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους σε νεαρή ηλικία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1 Γενικά.

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

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

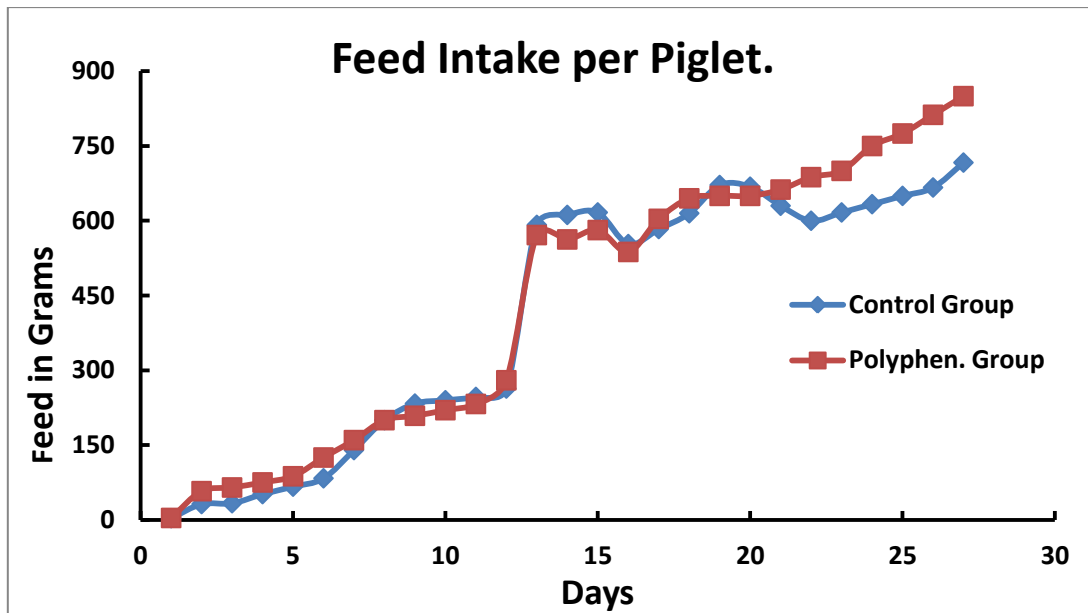
Στις 12 Οκτωβρίου 2013 γεννήθηκαν έντεκα (11) χοίροι από μια (1) χοιρομητέρα. Το γενετικό υπόβαθρο της χοιρομητέρας προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X Large White – Duroc – Pietrain (πατέρας).



Εικόνα 7. 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 των 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.

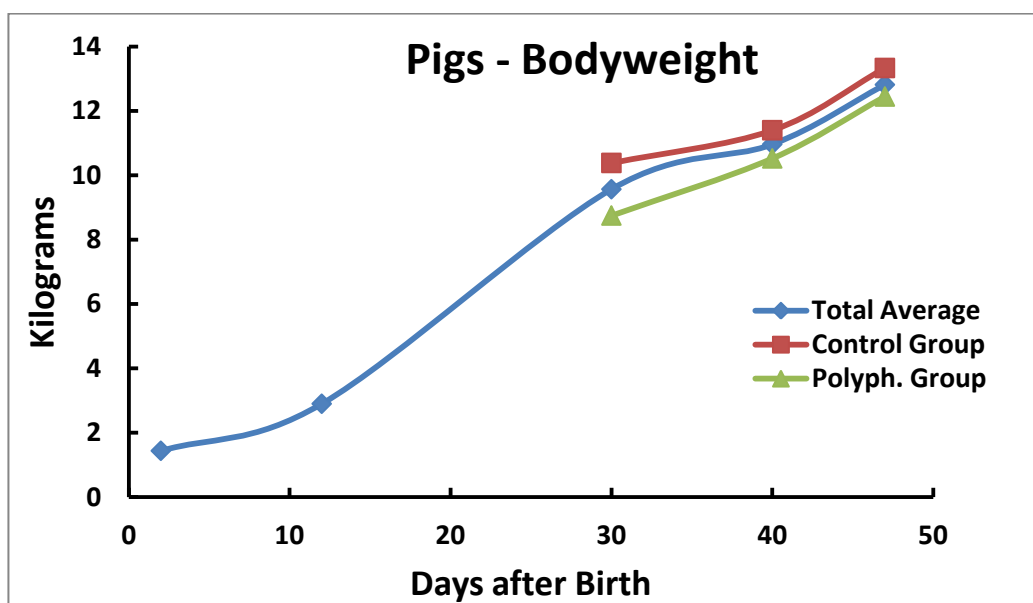
- Παρακολούθηση ανάπτυξης χοίρων (Ημερήσια αύξηση ζωικού βάρους, ημερήσια κατανάλωση τροφής).



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 πέρασμα των ημερών και μέχρι το τέλος του πειράματος.



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

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 εβδομάδα του απογαλακτισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τη χοιρομητέρα αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες.

Εκτέλεστηκαν τρεις (3) λήψεις καρδιακού, μυϊκού και νεφρικού ιστού (στις 14 και 24 Οκτωβρίου 2013 και στις 28 Νοεμβρ. 2013) και 2 λήψεις πνευμονικού ιστού (στις 24 Οκτωβρίου 2013 και στις 28 Νοεμβρ. 2013) στο Μικροσφαγείο που υπάρχει στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Θεσσαλίας.

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

- Ταχεία και ασφαλή μεταφορά των δειγμάτων των ιστών και τοποθέτησή τους σε ψυγείο στους -80°C .
- Επεξεργασία των δειγμάτων-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.

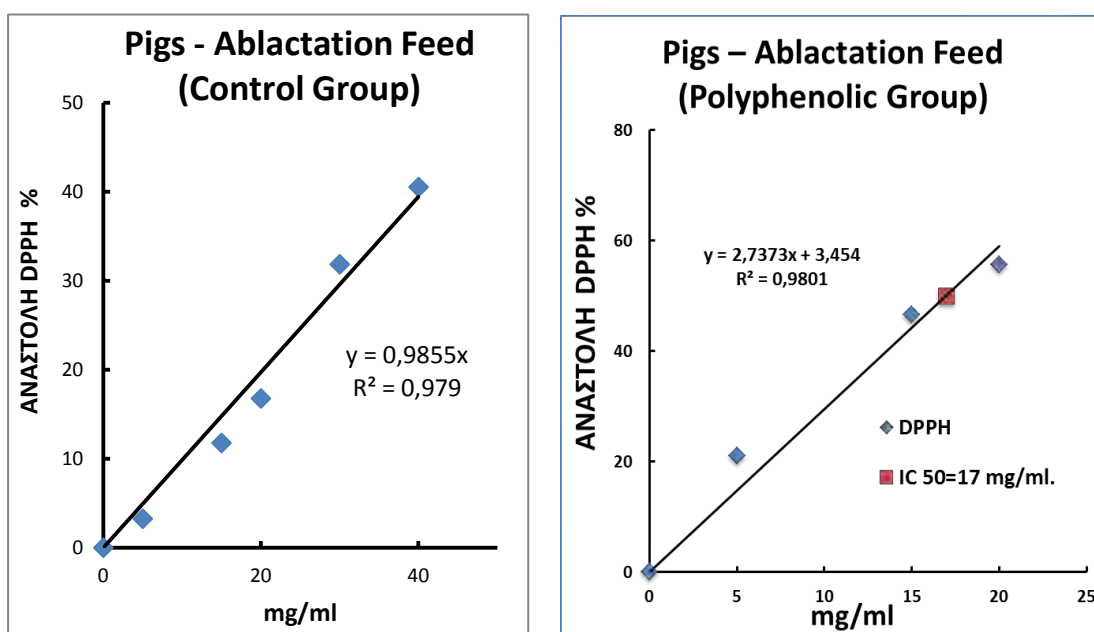
Ως καλαμπόκι Β, αναφέρεται το ενσίρωμα όπου περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι μια μέθοδος διατήρησης των χλωρών ζωοτροφών σε αναερόβιες συνθήκες.

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



Εικόνα 8. Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσκευή Δημιουργίας Κενού.

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 το πολυφαινολικό σιτηρέσιο έχει την τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση από ότι το σιτηρέσιο της ομάδας Α.

2.3. Ομογενοποίηση Ιστών

Πριν από τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες στα δείγματα των ιστών μας (καρδιακός, νεφρικός, μυϊκός και πνευμονικός), προηγουμένως έπρεπε να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση τους. Τα δείγματα των ιστών αφαιρέθηκαν χειρουργικά και τοποθετήθηκαν σε eppendorfs tubes των 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.
- Λιουπεππίνη (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 9. Τα Εργαλεία Που Χρησιμοποιήθηκαν Για Την Ομογενοποίηση Ιστών

Ακολουθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.(15.000 g - 5 min - 4°C).

2.4. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στους Ιστούς.

2.4.1. Γενικά.

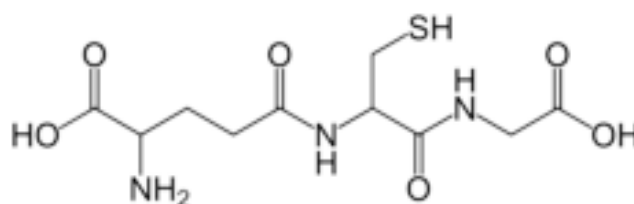
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ομογενοποιημένου ιστού. Για την αξιολόγηση 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.

2.4.2. Μέθοδοι.

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

2.4.2.1. Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστέινογλυκίνη) 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).

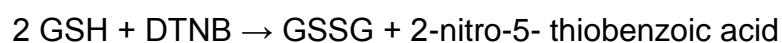


Εικόνα 10. Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.

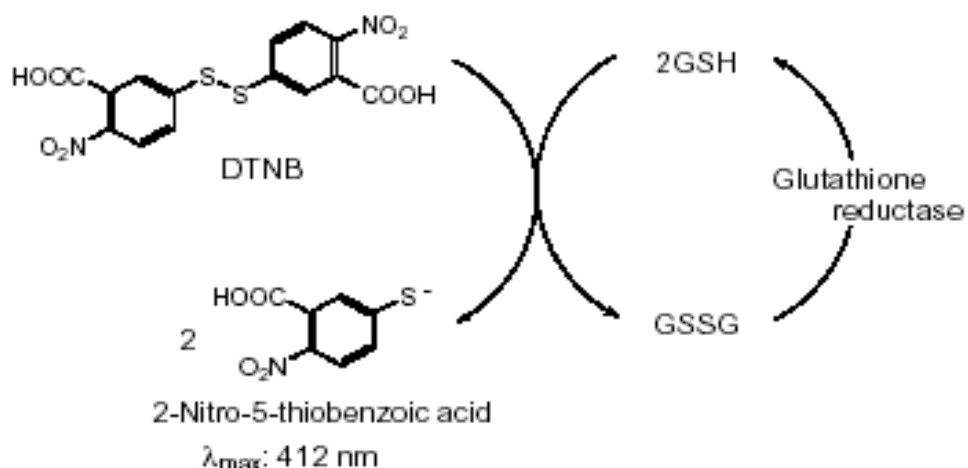
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων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

2.4.2.1.1. Αρχή της μεθόδου.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξειδωση της GSH από το διθειόδικο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται 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 11. Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

2.4.2.1.2. Αντιδραστήρια.

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

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

- **Κιτρικό Νάτριο**. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

2.4.2.1.3. Πειραματικό πρωτόκολλο.

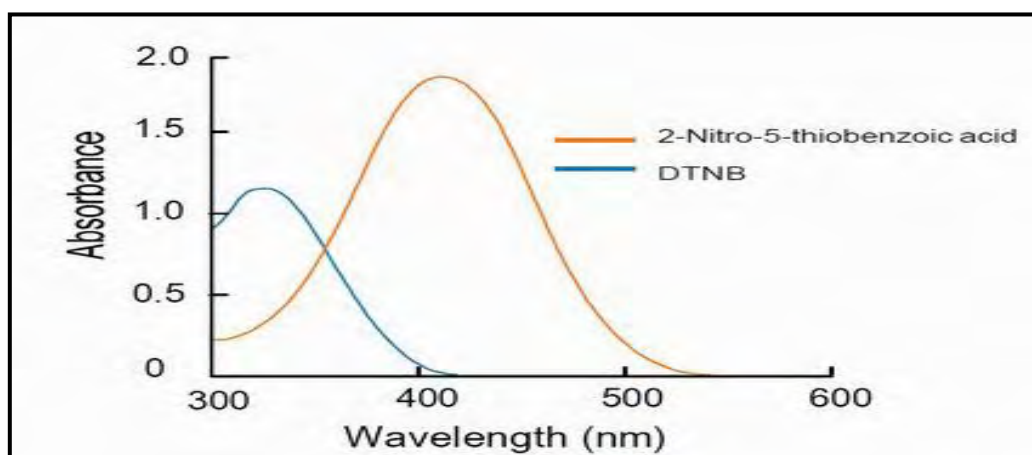
100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

Πίνακας 4. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 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. (Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952).



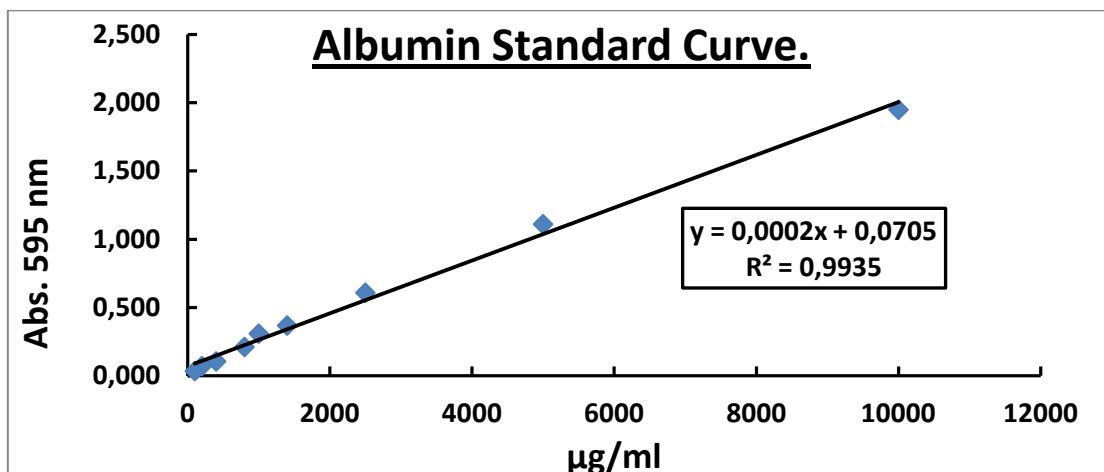
Absorption spectrum of 2-Nitro-5-thiobenzoic acid. (Dojindo Molecular Technologies).

2.4.2.1.4. Υπολογισμοί.

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

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 (αραιώση που έγινε από το TCA 5%) και πολλαπλασιάζουμε με 3, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

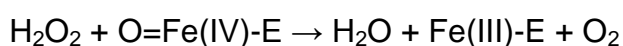
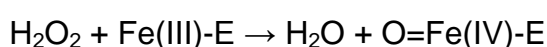


2.4.2.2. Δραστηριότητα της Καταλάσης.

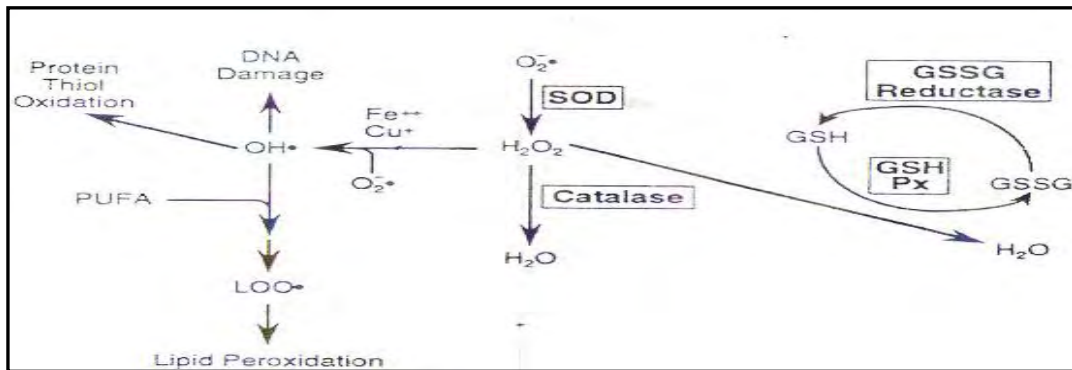
2.4.2.2.1 Αρχή της μεθόδου.

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 P, et. al., (2004)*. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (*Boon EM, et. al. (2007)*). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 12. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O

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



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

2.4.2.2.2. Αντιδραστήρια.

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

2.4.2.2.3. Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

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 μ L 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

2.4.2.2.4. Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (Δ Abs_{sample} per min / 40) x (75 x 1000 x 3 x 3) / Conc. Protein (mg/mL).

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

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Δ Abs = η μεταβολή της

απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

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

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

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

2.4.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η TAC των ιστών στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH^{\bullet}) 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.

2.4.2.3.2. 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 μ L του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

• **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση. Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

2.4.2.3.3. Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του

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

2.4.2.3.4. Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

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

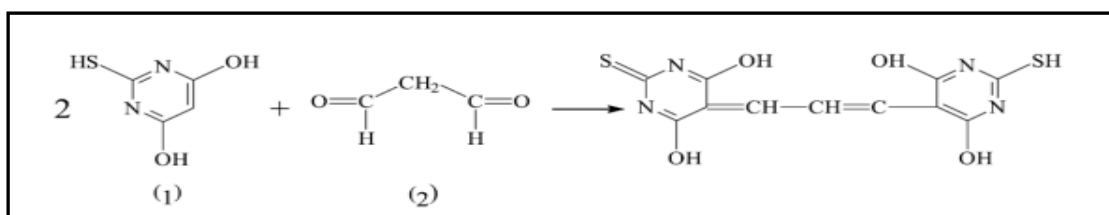
Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: $\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot.}$

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

2.4.2.4.1. 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 υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 13. 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.

2.4.2.4.2. 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 φτιάχεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

2.4.2.4.3. Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μ L από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

2.4.2.4.4. Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μ L) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μ L) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το $\mu\text{mol/L}$.

Πολλαπλασιάζουμε με 2 για τον μυϊκό και με 3 για καρδιακό-ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

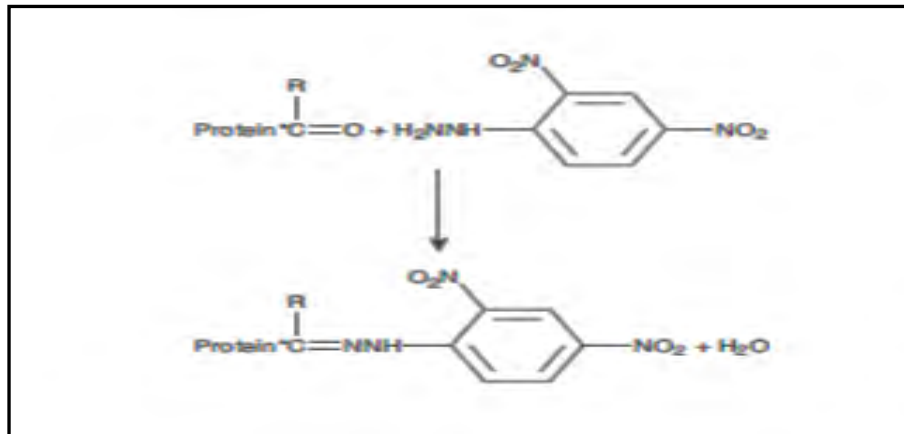
2.4.2.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.4.2.5.1. 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 δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

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



Εικόνα 14. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτριφαινουλυδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινουλυδραζονίου.

2.4.2.5.2. 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 απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- **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 απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

2.4.2.5.3. Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

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

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

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

*(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).

2.4.2.5.4. Υπολογισμοί.

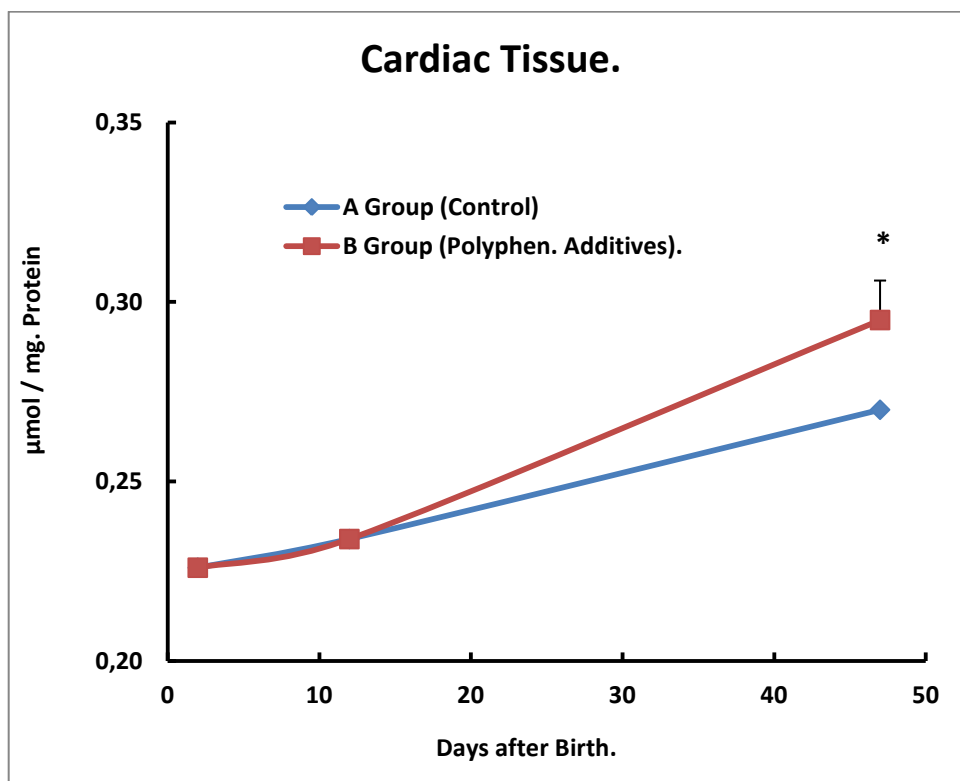
Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50 \times 3 \times 2 / \text{Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/mL)}$.

Όπου το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος), 3 είναι η αραίωση του δείγματος (1/3) κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και 2 είναι η αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

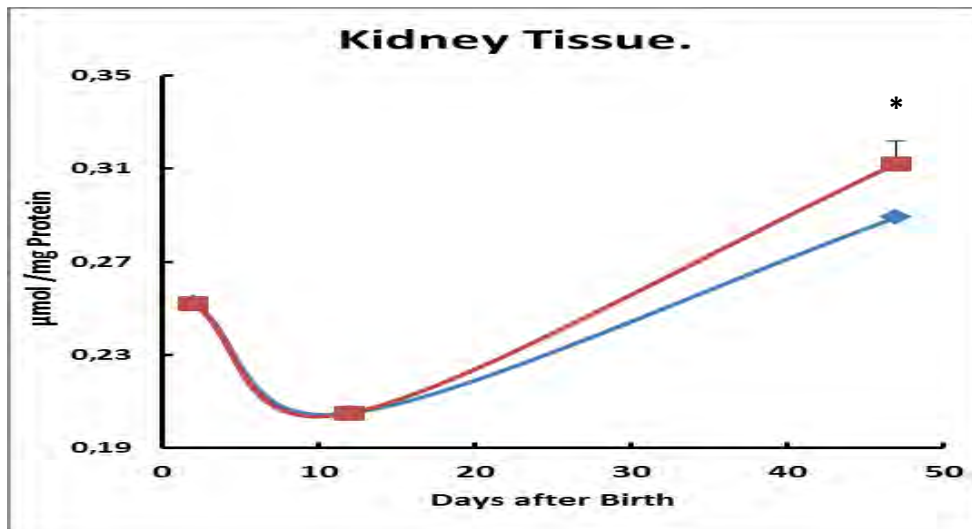
3.1. Αποτελέσματα Μέτρησης Γλουταθειόνης (GSH)

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 $*p < 0,05$



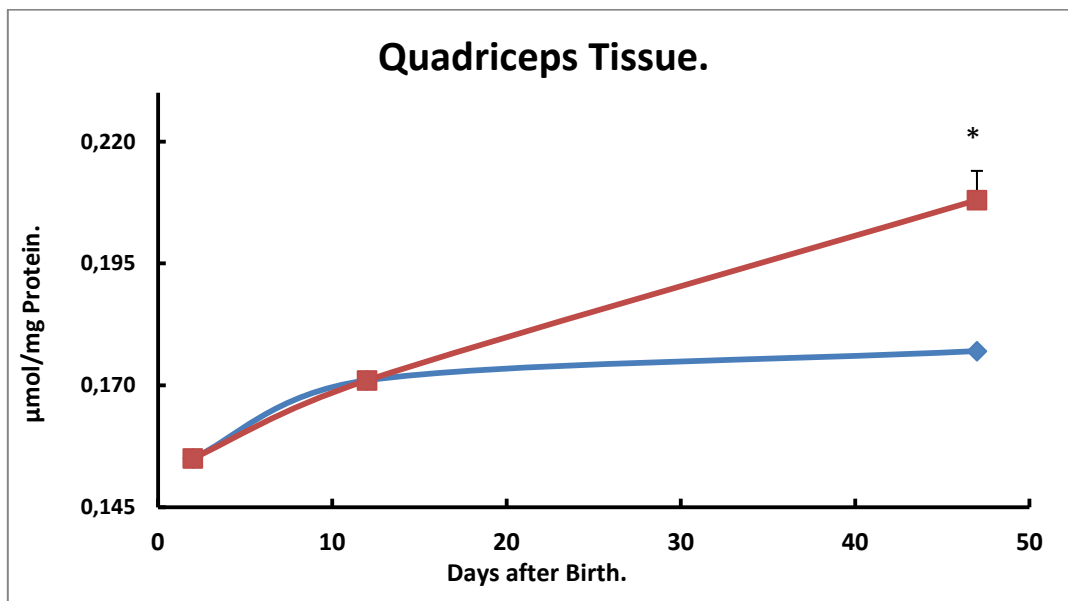
Διάγραμμα 4. GSH στον καρδιακό ιστό των χοίρων

Η Β ομάδα (Πολυφαινολικά πρόσθετα) στην τελευταία δειγματοληψία (γουρούνια 47 ημερών και μέσου βάρους 12,5 kg), παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 9,25% στον καρδιακό ιστό.



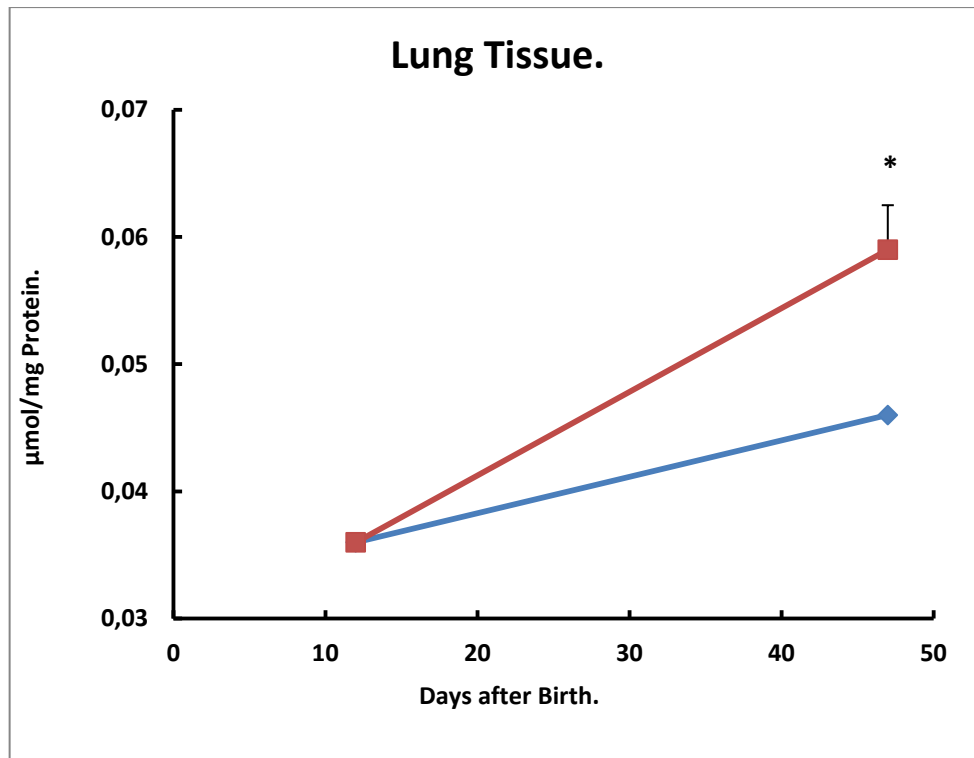
Διάγραμμα 5. GSH στο νεφρικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα (Πολυφαινολικά πρόσθετα) στην τελευταία δειγματοληψία (γουρούνια 47 ημερών και μέσου βάρους 12,5 kgr), παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 7,95% στο νεφρικό ιστό.



Διάγραμμα 6. GSH στο μυϊκό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα (Πολυφαινολικά πρόσθετα) στην τελευταία δειγματοληψία (γουρούνια 47 ημερών και μέσου βάρους 12,5 kgr), παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 17,51% στο μυϊκό ιστό.

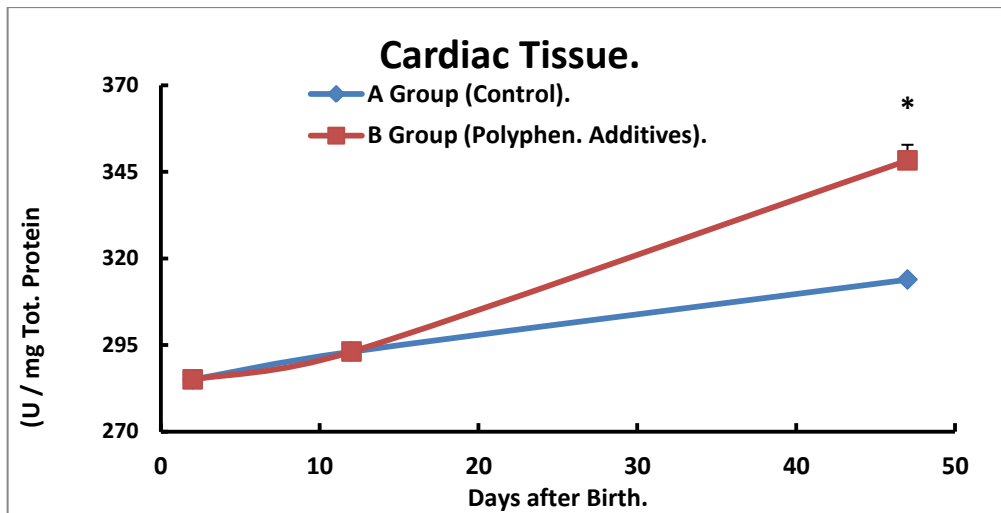


Διάγραμμα 7. GSH στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα (Πολυφαινολικά πρόσθετα) στην τελευταία δειγματοληψία (γουρούνια 47 ημερών και μέσου βάρους 12,5 kgr), παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές GSH σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 28,26% στον πνευμονικό ιστό.

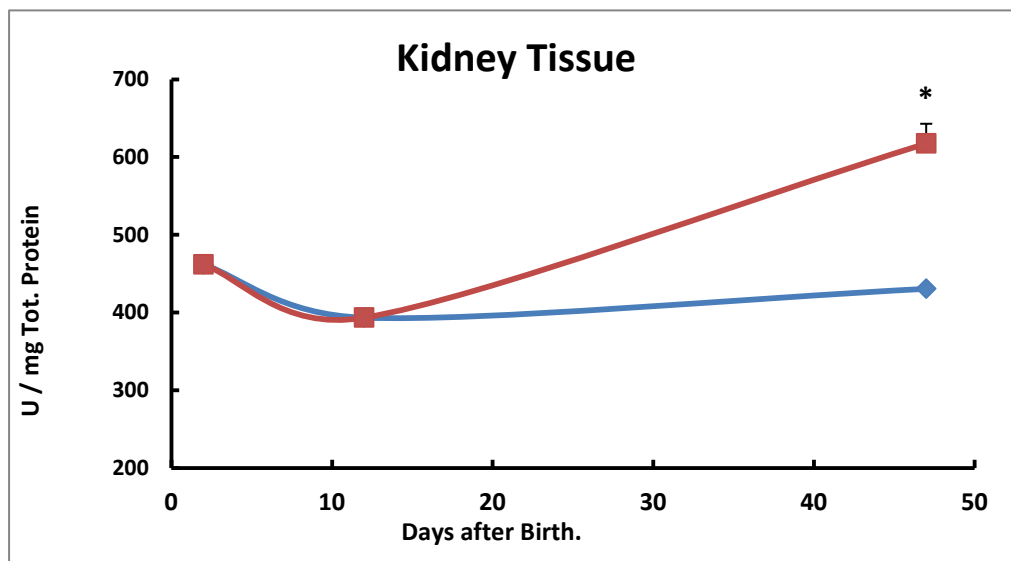
3.2. Αποτελέσματα Μέτρησης Δραστηριότητας της Καταλάσης (CAT).

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 Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$



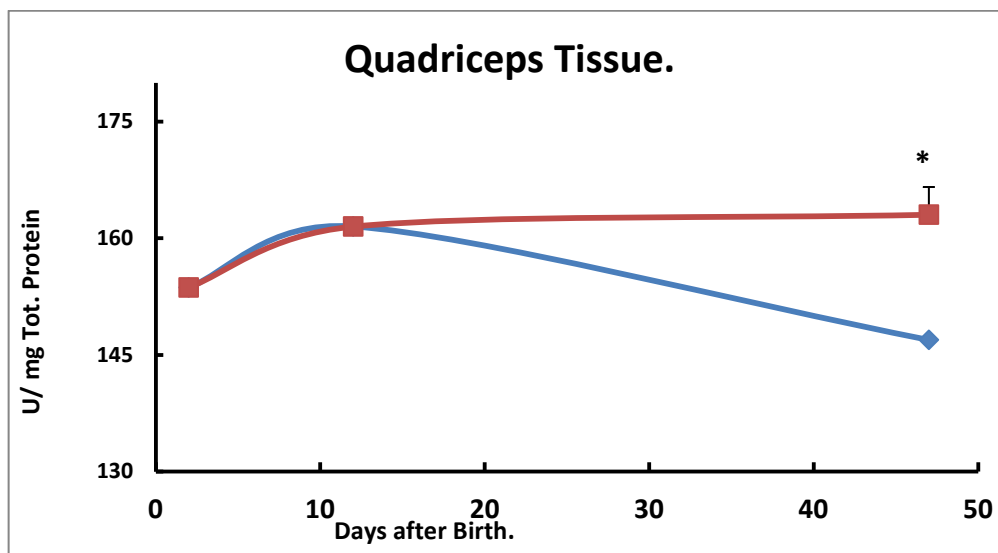
Διάγραμμα 8. *Catalase στον καρδιακό ιστό των χοίρων.*

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές δραστηριότητας της Καταλάσης, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 10,95% στον καρδιακό ιστό.



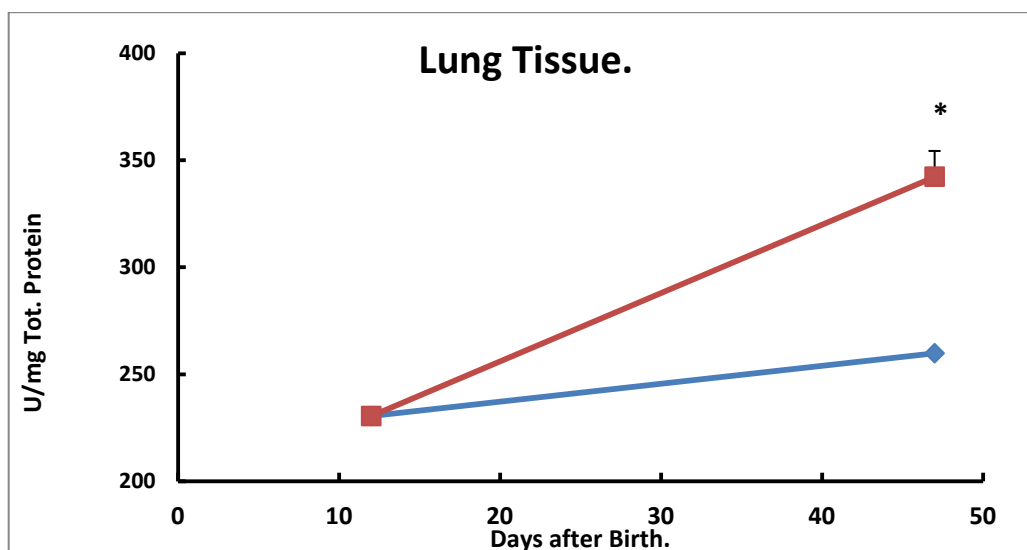
Διάγραμμα 9. *Catalase στο νεφρικό ιστό των χοίρων.*

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές δραστηριότητας της Καταλάσης, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 43,4% στο νεφρικό ιστό.



Διάγραμμα 10. *Catalase στο μυϊκό ιστό των χοίρων.*

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές δραστηριότητας της Καταλάσης, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 10,96% στο μυϊκό ιστό.

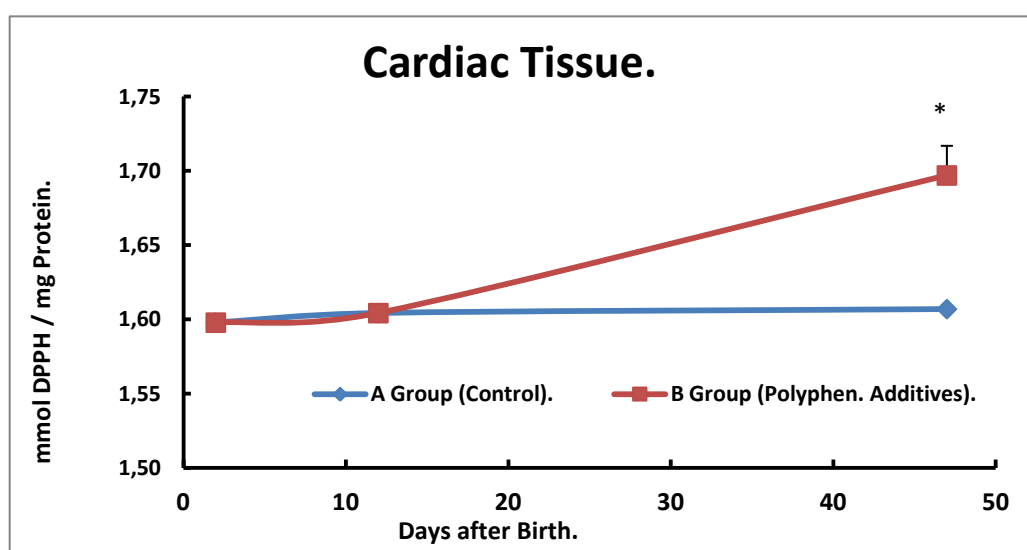


Διάγραμμα 11. *Catalase στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.*

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές δραστηριότητας της Καταλάσης, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 31,76% στον πνευμονικό ιστό.

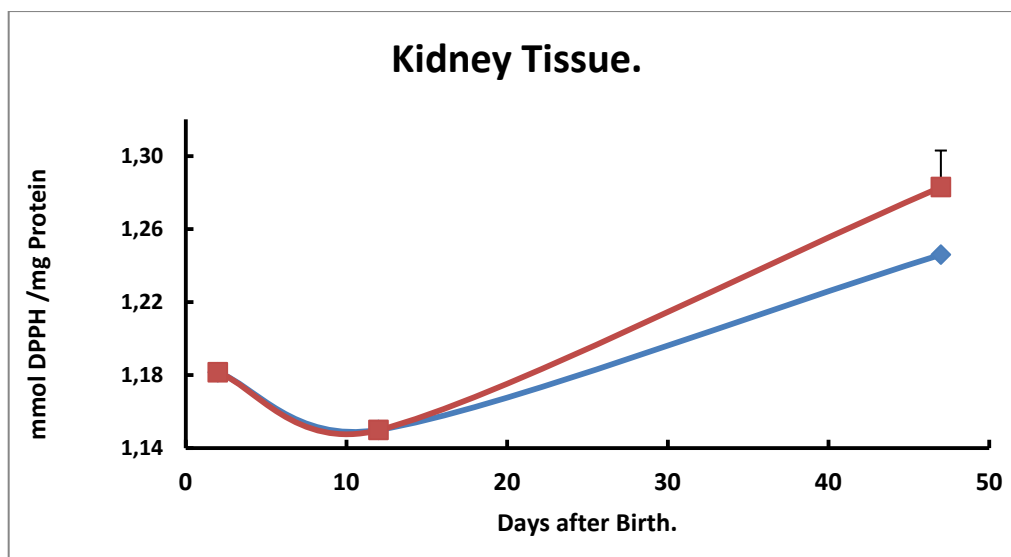
3.3. Αποτελέσματα Μέτρησης της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).

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 Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$



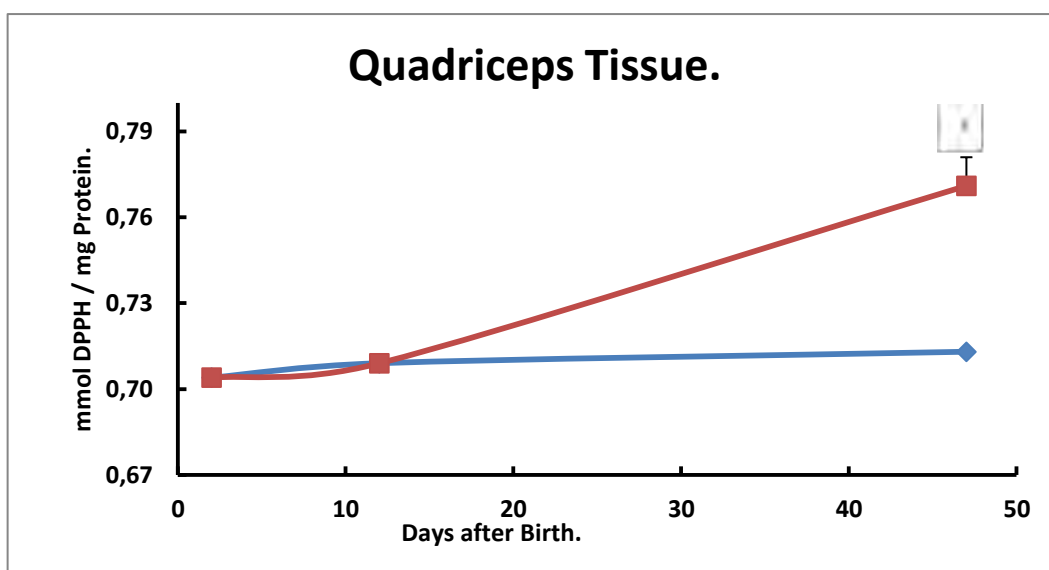
Διάγραμμα 12. TAC στον καρδιακό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές TAC, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 5,6% στον καρδιακό ιστό.



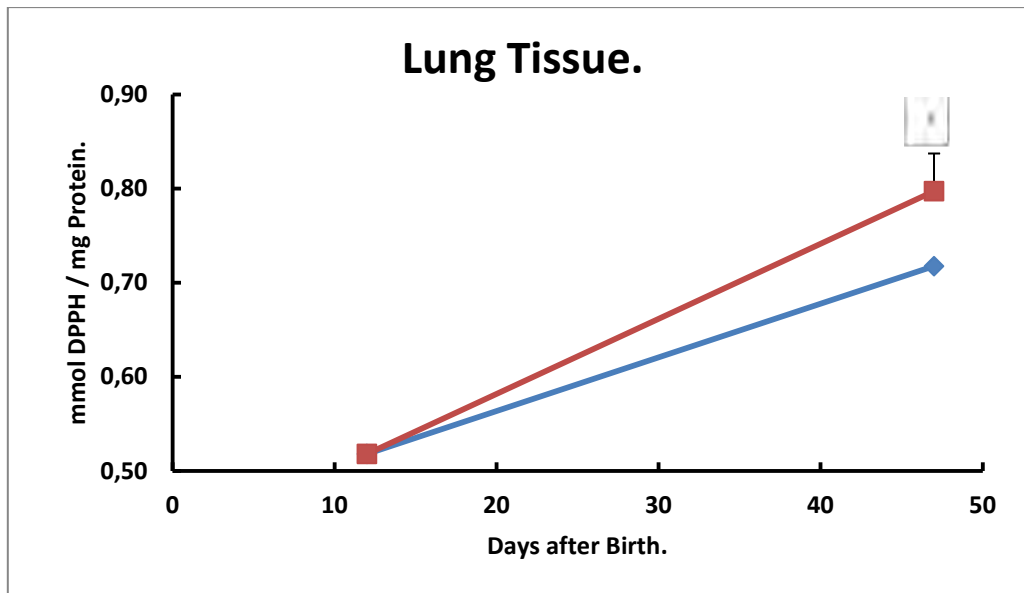
Διάγραμμα 13. TAC στο νεφρικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αύξηση στις τιμές TAC, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 2,96% στο νεφρικό ιστό, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 14. TAC στον μυϊκό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές TAC, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 8,13% στον μυϊκό ιστό.

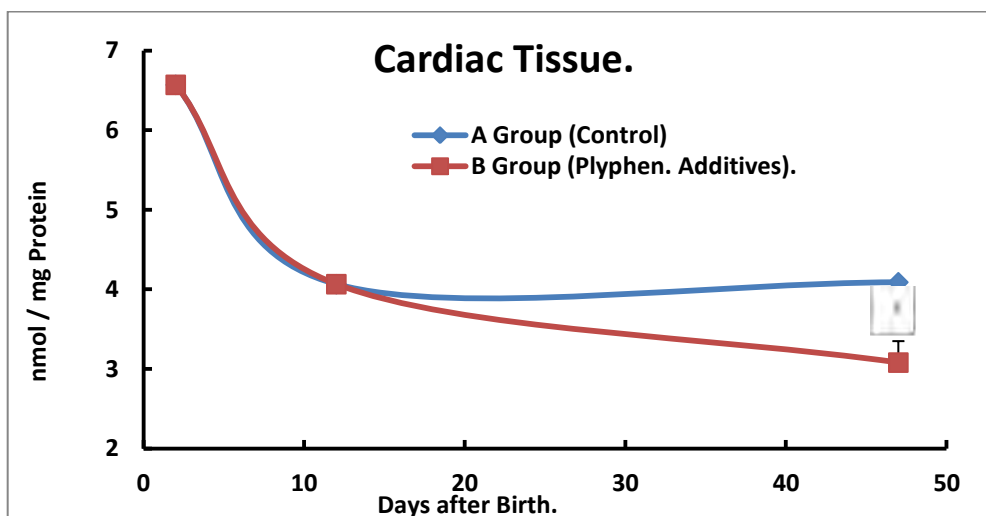


Διάγραμμα 15. TAC στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει αυξημένες στατιστικά σημαντικές τιμές TAC, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 11% στον πνευμονικό ιστό

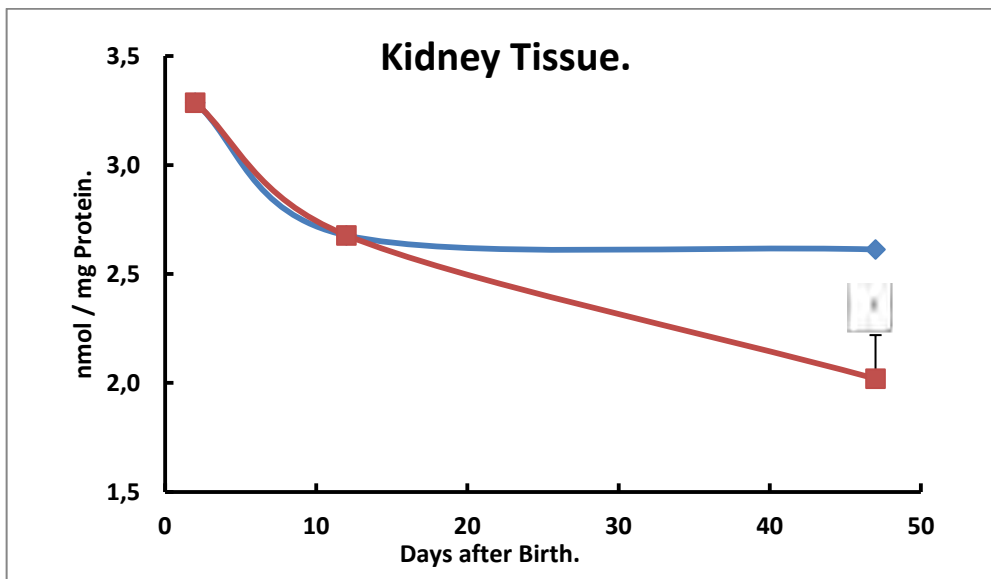
3.4 Αποτελέσματα μέτρησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

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 $*p < 0,05$



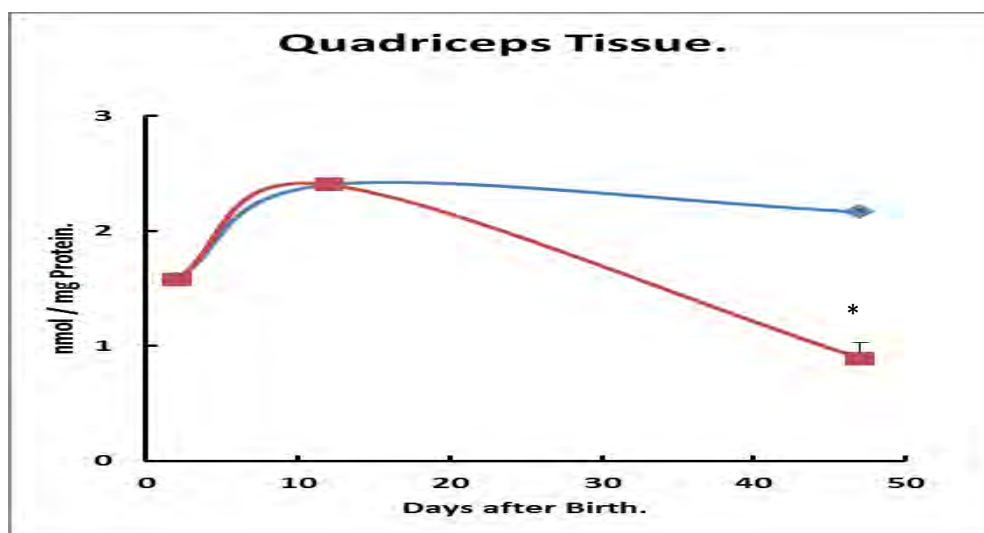
Διάγραμμα 16. TBARS στον καρδιακό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές TBARS, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 24,69%, στον καρδιακό ιστό.



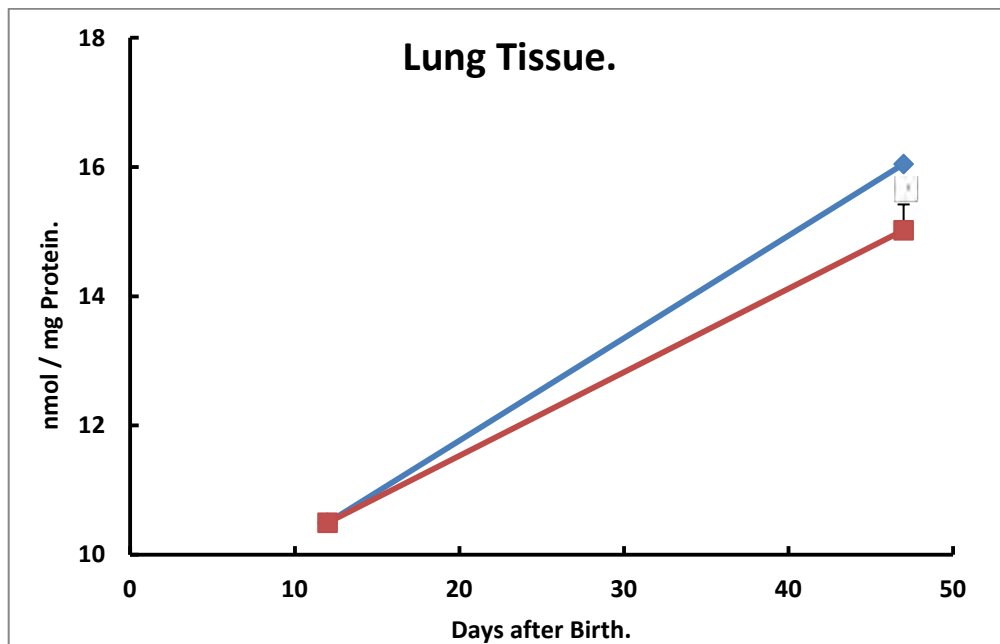
Διάγραμμα 17. TBARS στο νεφρικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές TBARS, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 22,7%, στο νεφρικό ιστό.



Διάγραμμα 18. TBARS στο μυϊκό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές TBARS, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 58,8%, στον μυϊκό ιστό.

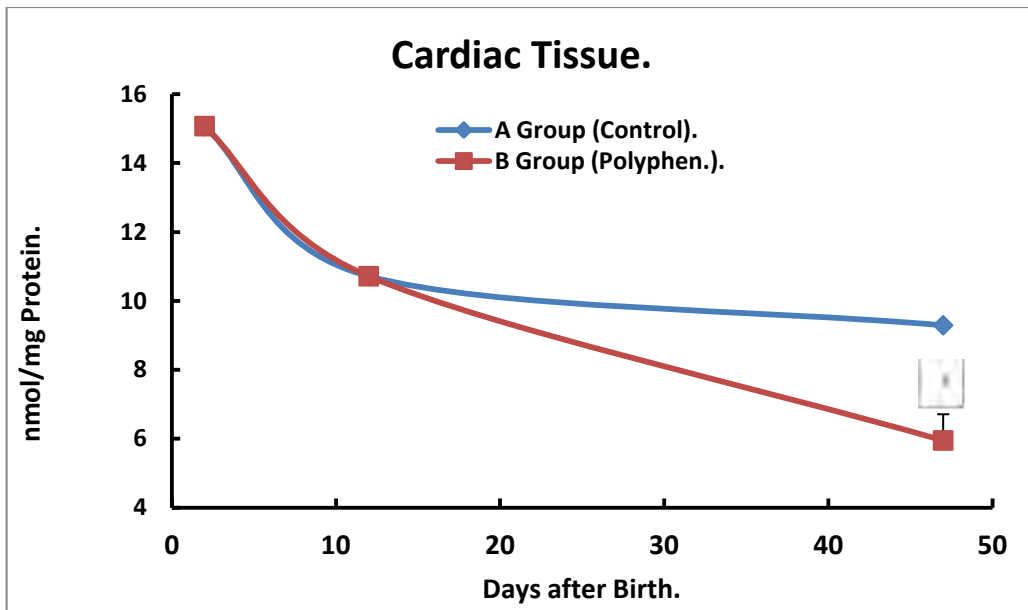


Διάγραμμα 19. TBARS στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές TBARS, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 6,4%, στον πνευμονικό ιστό.

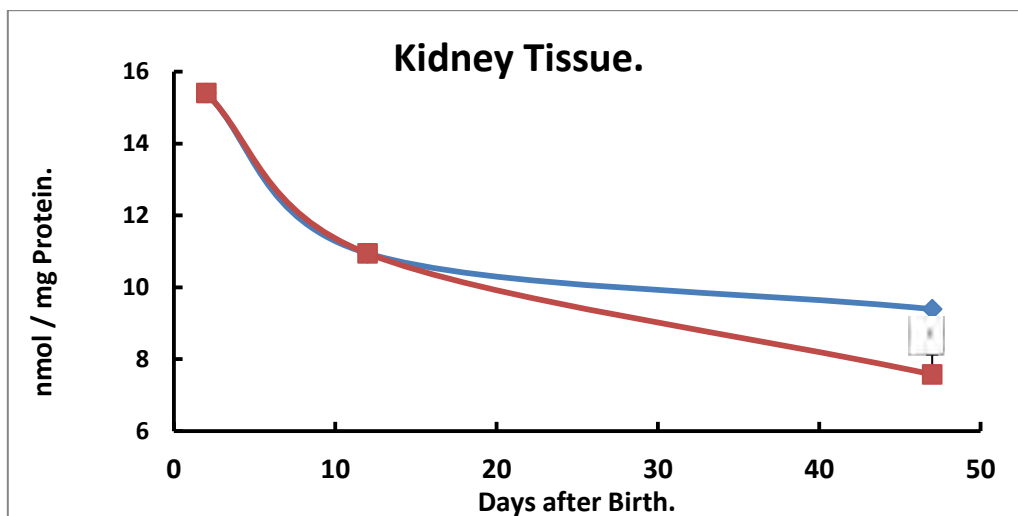
3.5. Αποτελέσματα Μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων.

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 $*p < 0,05$



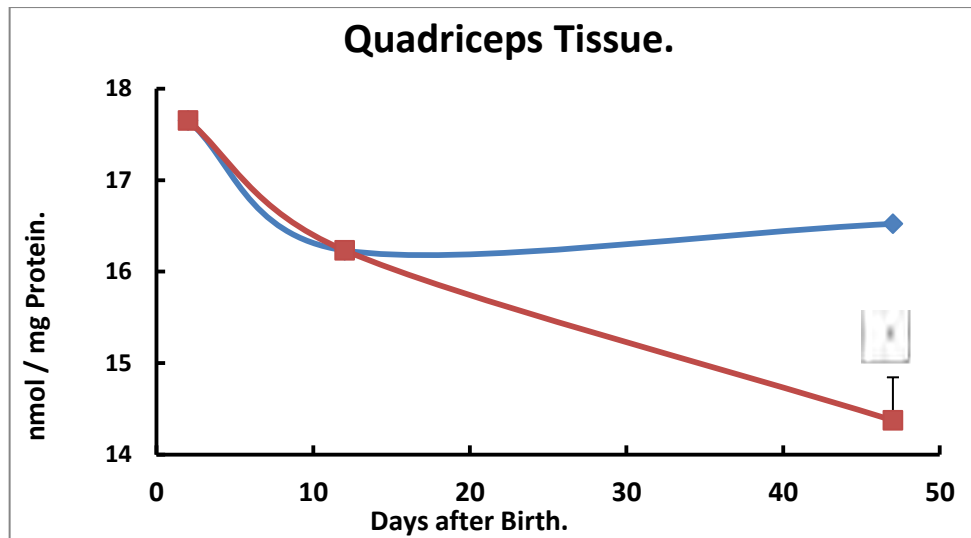
Διάγραμμα 20. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον καρδιακό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 35,97% στον καρδιακό ιστό



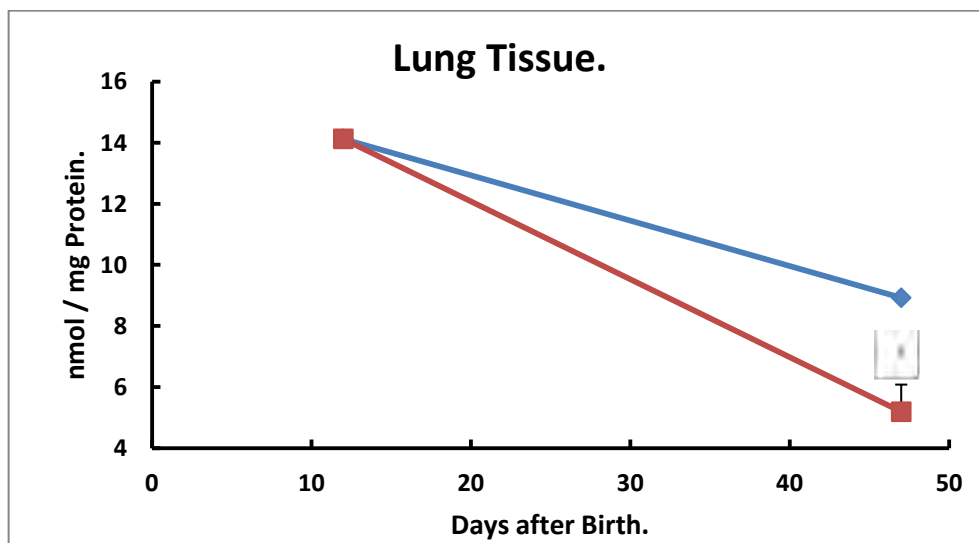
Διάγραμμα 21. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο νεφρικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 19,37% στο νεφρικό ιστό.



Διάγραμμα 22. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον μυϊκό ιστό των χοίρων.

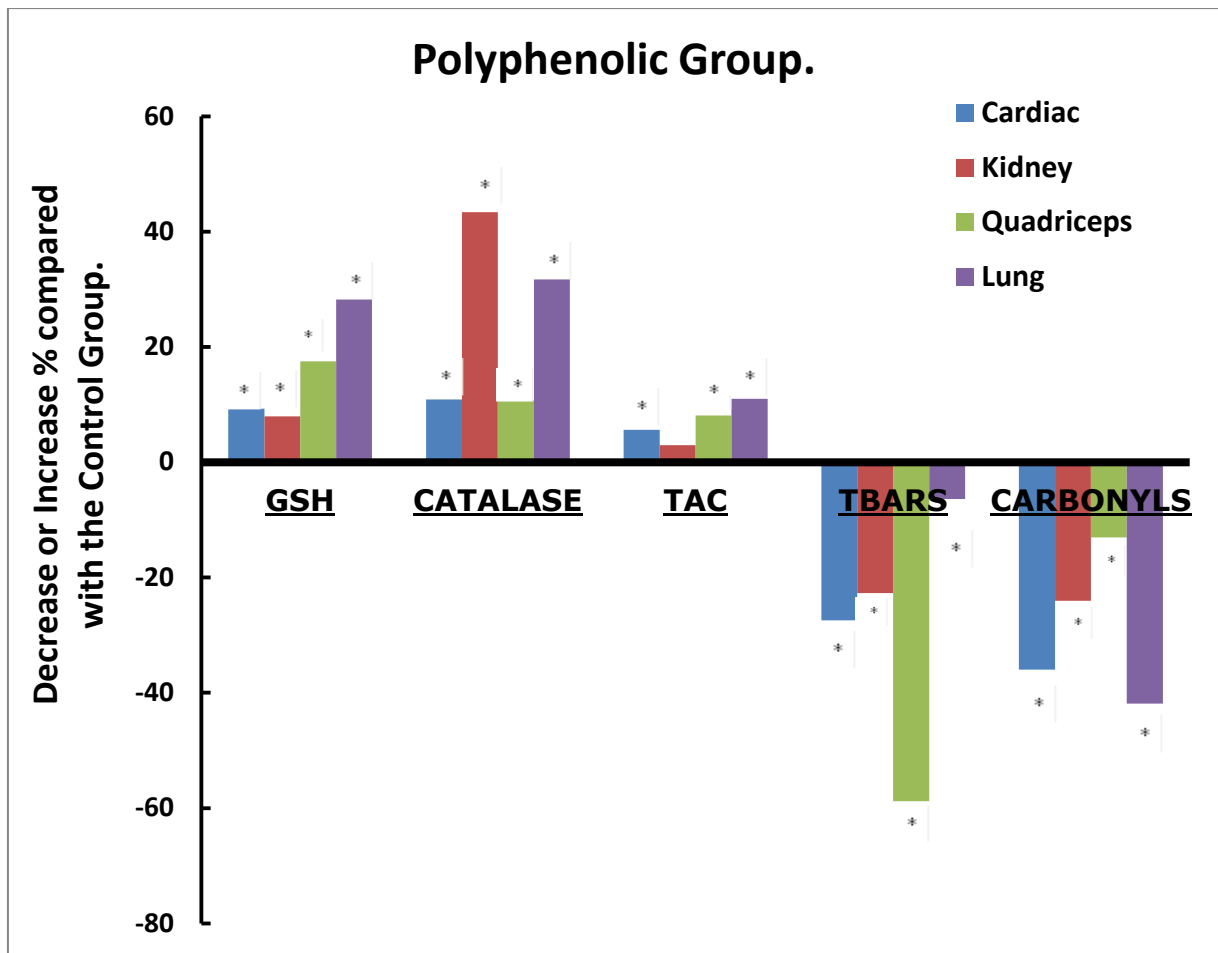
Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 13,02% στον μυϊκό ιστό.



Διάγραμμα 23. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον πνευμονικό ιστό των χοίρων.

Η Β ομάδα στην τελευταία δειγματοληψία, παρουσιάζει μειωμένες στατιστικά σημαντικές τιμές Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων, σε σχέση με την Α ομάδα (Control), κατά 41,86% στον πνευμονικό ιστό.

3.6. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Μετρήσεων.



Διάγραμμα 24. Σύγκριση των Αποτελεσμάτων Μετρήσεων της Πολυφαινολικής ομάδας στους ιστούς των χοίρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Στις δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν στις πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, από το έτος 2001 μέχρι και σήμερα, με πρόσφατες των (Yamada K, et.al. 2009, Viveros A. et. al. 2011), δεν συναντάται μελέτη στην οποία να γίνεται αναφορά, στην παραγωγή φυσικών εκχυλισμάτων, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα φυτικά νερά του ελαιοκάρπου και στην ολοκληρωμένη αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους σε ζωικούς οργανισμούς. Η προσέγγιση του θέματος μέχρι και σήμερα είχε ως αποτέλεσμα, έργο που αφορούσε στην λήψη πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε.), σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η έρευνα προσανατολίστηκε πιλοτικά, σε νεαρά γουρούνια κρεατοπαραγωγής και στην μέτρηση δεικτών του οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς των.

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 στον καρδιακό, νεφρικό, μυϊκό και πνευμονικό ιστό. Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, εντοπίστηκε η συμπεριφορά των δεικτών σε σχέση με το χρόνο, αλλά και αυτή μεταξύ των ομάδων (ομάδα ελέγχου και ομάδα πολυφαινολών) στους ιστούς.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα 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.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) δειγματοληψίες ιστών στα χρονικά διαστήματα: δύο (2), δώδεκα (12) και σαράντα οκτώ (48) ημερών μετά από την 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.

Συγκεκριμένα και σε ηλικία 47 ημερών, η πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όσον αφορά στην TAC παρουσιάζει αύξηση τιμών στατιστικά σημαντική στον καρδιακό ιστό κατά 5,6%, στον τετρακέφαλο κατά 8,13%, και στον πνευμονικό ιστό την μεγαλύτερη αύξηση κατά 11% (0,797 mmol DPPH/mg protein). Επίσης, τα αποτελέσματα στην μέτρηση της καταλάσης έδειξαν αύξηση στην δραστηριότητα του ενζύμου από 10,96% στον τετρακέφαλο ιστό μέχρι και 43,39% στον νεφρικό ιστό (617,5 U/mg protein). Παρατηρήθηκε στην πολυφαινολική ομάδα μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε όλους τους ιστούς από 6,4% στον πνευμονικό ιστό έως και 58,8% στον τετρακέφαλο (0,892 nmol/mg protein). Η οξειδωση των πρωτεϊνών μειώθηκε στην πολυφαινολική ομάδα από 13,02% στον τετρακέφαλο μέχρι 41,86% στον πνευμονικό ιστό (5,191 nmol/mg protein). Τέλος, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) παρουσιάζεται αυξημένη στην πολυφαινολική ομάδα με τιμές από 9,25% στον καρδιακό ιστό έως και 28,26% στον πνευμονικό ιστό (0,059 μmol/mg protein).

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που αφορούσε στη διατροφή χοίρων στην περίοδο του απογαλακτισμού και στον έλεγχο των δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς αυτών, είναι θετικά και ενθαρρυντικά. Όπως αποδεικνύεται το υγρό αντιοξειδωτικό που προέρχεται από τα Υ.Α.Ε. και που προστέθηκε στο σιτηρέσιο του απογαλακτισμού, ενίσχυσε σημαντικά την αντιοξειδωτική άμυνα των νεαρών χοιριδίων.

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι τα νεαρά χοιρίδια αναπτύσσονται σε συνθήκες κλειστού ενσταυλισμού, που όσο και καλές να είναι δεν παύει να είναι περισσότερο στρεσογόνες σε σχέση με αυτές του ελεύθερου ενσταυλισμού. Συνεπώς, τα νεαρά χοιρίδια που καταναλώνουν το πολυφαινολικό σιτηρέσιο και παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική άμυνα αναπτύσσονται και ομαλότερα σε σχέση με τα άλλα.

Το υγρό αντιοξειδωτικό, αλλά και η ενθυλάκωση αυτού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία, για ενίσχυση – βελτίωση προϊόντων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων, έτσι ώστε, με την κατάλληλη

προσθήκη αυτών σε ποτό, τρόφιμο ή φαρμακευτικό σκεύασμα, να προσδίδονται οι θετικές ιδιότητες του ελαιολάδου.

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 απομόνωσης 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 ικανότητες τους, θα μπορούσε να προκύψει ένα προϊόν με αυξημένη προστιθέμενη αξία.

Για να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό χοίρων, όπως επίσης και η παρακολούθηση μίας μελλοντικής χοιρομητέρας που να λαμβάνει πολυφαινολικό σιτηρέσιο από νεαρή ηλικία, με σκοπό την απόκτηση δεδομένων που να αφορούν την επόμενη γενιά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Aebi, H. (1984) **Catalase in vitro** *Methods Enzymol.* 105, 121–126.

Agalias A., Magiatis P., Skaltsounis A., Mikros E., Tsarbopoulos A., Gikas E., Spanos I., Manios T. (2007) **A New Process for the Management of Olive Oil Mill Waste Water and Recovery of Natural Antioxidants**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (7), pp 2671–2676.

Ahmad A. Deeb., Manar K., Fayyad and Mahmoud A. Alawi. (2012) **Seperation of Polyphenols from Jordian Olive Oil Mill Wastewater**, *Chromatography Research International*
Volume 2012 (2012), Article ID 812127.

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

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

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.*

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.

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

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

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

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

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

Gkoutsidis, 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.

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*

Kalogerakis N, Politi M, Foteinis S, Chatzisyneon E, Mantzavinos D. (2013), **Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management,** *J Environ Manage*

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. Minadian 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

Massimo D'Archivio, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio and Roberta Masella (2010), **Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies**

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

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

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

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

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

Stéphane Quideau, Dr. Denis Deffieux, Dr. Céline Douat-Casassus and Dr. Laurent Pouységou (2011), **Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis**, *Angewandte Chemie International Edition* Volume 50, Issue 3, pp586–621.

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.

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.