



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ, ΚΑΡΔΙΑ, ΣΠΛΗΝΑ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΔΙΑ
ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIG TISSUES
(BRAIN,CARDIAC,SPLEEN) IN ABLACTATION PERIOD TREATED
WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES**

ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ ΣΤΑΜΑΤΗ

Λάρισα 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με πάντα με στηρίζουν για να καταφέρω να γίνω αυτό που ονειρεύομαι.

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.

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για τη συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του.

Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ/Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κώστα Γερασόπουλο που με βοήθησε καθ'όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω το πρακτικό (πειραματικό) μέρος με επιτυχία αλλά και στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Πάντα παρών με όρεξη, γνώσεις και ευχάριστη διάθεση, εμπειρία και θέληση να μας μαθαίνει συνεχώς νέα πράγματα.

Τέλος, ο υποψήφιος διδάκτορας Νίκος Γκουτζουρέλας με βοήθησε πολύ με τις συμβουλές του κ τις γνώσεις του, γι' αυτό και τον ευχαριστώ πάρα πολύ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για τους στόχους της παρούσας εργασίας εκτράφηκαν είκοσι (26) χοιρίδια τα οποία διαχωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Στην πρώτη ομάδα, η οποία αποτελούσε την ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε κανονικό σιτηρέσιο για χοίρους, ενώ το σιτηρέσιο της δεύτερης ομάδας περιείχε επιπλέον επεξεργασμένα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Στα αρχικά στάδια του πειράματος παρασκευάστηκε ενσίρωμα το οποίο περιείχε τα ΥΑΕ και συγκεκριμένα το κατακράτημα των αποβλήτων, που προήλθε ως παραπροϊόν μετά από το πέρασμα αυτών από κεραμικές μεμβράνες μικροδιήθησης. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο σιτηρέσιο των χοίρων που ανήκαν στην πολυφαινολική ομάδα. Εκτελέστηκαν 4 ιστοληψίες - αιμοληψίες (στις 2, 20, 35 και 50 ημέρες μετά την γέννηση). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ο εγκεφαλικός, ο καρδιακός και ο ιστός σπλήνας από το σύνολο των 9 ιστών που ελήφθησαν. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να μελετηθεί εάν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των χοιριδίων σε νεαρή ηλικία.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν ήταν: η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total Antioxidant Capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric Acid Reactive Substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι όλοι οι δείκτες του οξειδωτικού στρες και στις πέντε (5) μετρήσεις βελτιώθηκαν αισθητά και στους τρεις (3) ιστούς. Συνεπώς, από τα παραπάνω αποδείχτηκε η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ ύστερα από χορήγησή τους σε χοίρους κρεατοπαραγωγής νεαρής ηλικίας.

ABSTRACT

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

For this reason, 26 young pigs were divided into two (2) groups. The control group, with the basic diet throughout the experiment, while the other group was received special feed with polyphenolic additives. In the initial stages of the experiment, silage was prepared by adding OMWW, named as retentate from OMWW that came from ceramic microfiltration of the OMWW. The silage added to the feed ration. Four (4) tissue and blood extractions were performed (2, 20, 35 and 50 days after birth). From the 9 different types of tissues that were extracted in total, this study analyses the tissues from brain, cardiac and spleen. Experiments were performed in order to determine whether the antioxidant mechanisms of piglets at a young age could be strengthened. The oxidative stress indicators were assessed using the following techniques: reduced glutathione (GSH), the activity of catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC-Total Antioxidant Capacity), substances that react with thiobarbituric acid (TBARS-Thiobarbituric Acid Reactive Substances) and protein carbonyls. The experimental results showed that measurements of all five (5) indicators of oxidative stress were significantly improved in all three (3) tissues. Thus, polyphenol additives from processed OMWW, after administration to young piglets, enhance their antioxidant capacity.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	8
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	9
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. Πολυφαινόλες.....	12
1.1.1 Γενική Δομή και Κατηγορίες.....	12
1.1.2 Χημειοπροστατευτική ικανότητα.....	14
1.2. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου.....	14
1.2.1 Συστατικά ΥΑΕ.....	14
1.2.2 Χαρακτηριστικά ΥΑΕ.....	15
1.2.3 Πολυφαινόλες ΥΑΕ.....	16
1.3. Οξειδωτικό Στρες.....	17
1.3.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	17
1.3.2 Δραστικά Είδη O_2	19
1.3.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες.....	20
1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου.....	22
1.3.5 Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.....	23
1.4 Προστατευτικός Ρόλος των Πολυφαινολών από Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ).....	24
1.4.1 Καρδιαγγειακό.....	25
1.4.2 Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα.....	26
1.4.3 Καρκίνος.....	27

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Γενικά.....	28
2.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου.....	31
2.2.1 Εισαγωγή.....	31
2.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.....	34
2.2.3 Παρασκευή Πολυφαινολικού Σιτηρεσίου.....	35
2.3 Ιστοληψία-Ομογενοποίηση Ιστών.....	37
2.4 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.....	38
2.4.1 Γενικά.....	38
2.4.2 Μέθοδοι.....	39
2.5 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Ιστό της Σπλήνας, Εγκεφαλικό και Καρδιακό	53
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων.....	14
Εικόνα 2: Παραδείγματα πολυφαινολικών ενώσεων των ΥΑΕ.....	17
Εικόνα 3: Ασταθές μόριο	18
Εικόνα 4: Βλάβες των βιολογικών μορίων λόγω δράσης ελεύθερων ριζών.....	19
Εικόνα 5: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.....	21
Εικόνα 6: Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale et.al., 2010)...	24
Εικόνα 7: Προτεινόμενο μοντέλο για τους μηχανισμούς δράσης της ελευρωπαΐνης του ελαϊκού οξέως και άλλων ενώσεων του ελαιολάδου, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία.....	29
Εικόνα 8: Ομογενοποίηση Ιστών.....	37
Εικόνα 9: Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.....	38
Εικόνα 10: Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.....	39

Εικόνα 11: Μονοπάτι Αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O	42
Εικόνα 12: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή μορίου TBA-MDA.....	47
Εικόνα 13: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δίνιτριφαιλυδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαιλυδραζονίου.....	49

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Κυριότερα είδη ΔΕΟ.....	19
Πίνακας 2: Μέσος Όρος Μέτρησης Βάρους των Χοιριδίων.....	29
Πίνακας 3: Μέτρηση pH Ενσιρωμάτων.....	35
Πίνακας 4: Σύσταση Σιτηρεσίων.....	35
Πίνακας 5: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.....	40
Πίνακας 6: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.....	43
Πίνακας 7: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της TAC.....	46
Πίνακας 8: Αύξηση GSH στον Εγκεφαλικό Ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	54
Πίνακας 9: Αύξηση GSH στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	55
Πίνακας 10: Αύξηση GSH στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	56
Πίνακας 11: Αύξηση Καταλάσης στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	57
Πίνακας 12: Αύξηση Καταλάσης στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχο.....	58

Πίνακας 13: Αύξηση Καταλάσης στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	59
Πίνακας 14: Αύξηση TAC στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	60
Πίνακας 15: Αύξηση TAC στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	61
Πίνακας 16: Αύξηση TAC στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	62
Πίνακας 17: Μείωση TBARS στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	63
Πίνακας 18: Μείωση TBARS στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	64
Πίνακας 19: Μείωση TBARS στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	65
Πίνακας 20: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	66
Πίνακας 21: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	67
Πίνακας 22: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.....	68

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου από την Εικοστή Μέρα της Γέννησης Μέχρι την Πεντηκοστή.....	28
Διάγραμμα 2: Αύξηση στα Βάρη των Χοίρων σε Σχέση με το Χρόνο.....	29
Διάγραμμα 3: Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων.....	36
Διάγραμμα 4: Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης.....	52
Διάγραμμα 5: GSH στον Εγκεφαλικό Ιστό (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία).....	54
Διάγραμμα 6: GSH στον Ιστό της Σπλήνας.....	55
Διάγραμμα 7: GSH στον Καρδιακό Ιστό.....	56
Διάγραμμα 8: Καταλάση στον Εγκεφαλικό Ιστό (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία).....	57
Διάγραμμα 9: Καταλάση στον Ιστό της Σπλήνας.....	58
Διάγραμμα 10: Καταλάση στον Καρδιακό Ιστό.....	59
Διάγραμμα 11: TAC στον Εγκεφαλικό Ιστό (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία).....	60
Διάγραμμα 12: TAC στον Ιστό Σπλήνας των Χοίρων.....	61
Διάγραμμα 13: TAC στον Καρδιακό Ιστό των Χοίρων.....	62
Διάγραμμα 14: TBARS στον Εγκεφαλικό Ιστό των Χοίρων.....	63
Διάγραμμα 15: TBARS στον Ιστό της Σπλήνας.....	64
Διάγραμμα 16: TBARS στον Καρδιακό Ιστό των Χοίρων.....	65
Διάγραμμα 17: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Εγκεφαλικό Ιστό.....	66
Διάγραμμα 18: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ιστό της Σπλήνας.....	67
Διάγραμμα 19: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Καρδιακό Ιστό.....	68
Διάγραμμα 20: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 35 Ημερών).....	69
Διάγραμμα 21: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 50 Ημερών).....	69

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά Για Τις Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων που απαντώνται κατά αποκλειστικότητα στο φυτικό βασίλειο, ενώ η ανεύρεση τους σε ζωικά προϊόντα προέρχεται από την κατανάλωση αυτών μέσω της τροφής των ζώων. Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Ουσιαστικά, οι πολυφαινόλες αποτελούν δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού των φυτών και σκοπό έχουν να ενισχύσουν τη φυσική άμυνα του φυτού σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία. Για παράδειγμα, η φλούδα του μήλου σε σχέση με το εσωτερικό του είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν ως σκοπό να το προστατεύσουν από την ηλιακή ακτινοβολία αλλά και από επιβλαβή έντομα.

Οι πολυφαινόλες δεν αποδίδουν θερμίδες και η απουσία τους είναι συμβατή με τη ζωή του ανθρώπου σε αντίθεση με τις βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία. Παρόλα αυτά τα οφέλη τους στην υγεία είναι πολλαπλά και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Τα σπουδαιότερα αυτών είναι η αντιοξειδωτική δράση, η επίδραση στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών και την απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων, η αντικαρκινική δράση, η αντιμικροβιακή δράση και οι αντιαλλεργικές ιδιότητες. Τρόφιμα στα οποία έχουν αποδοθεί ευεργετικές επιδράσεις εξαιτίας του υψηλού σε πολυφαινόλες περιεχομένου τους είναι το ελαιόλαδο, το κρασί, το κακάο, ο καφές, τα φρούτα και τα λαχανικά με έντονο χρώμα, τα προϊόντα ολικής άλεσης, το τσάι και άλλα αφεψήματα βοτάνων.

1.1.1 Γενική Δομή Και Κατηγορίες Πολυφαινολών

Δομή

Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια προδρόμη ένωση, το σικιμικό οξύ. Κυρίως απαντώνται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα υπολείμματα σακχάρων που συνδέονται με υδροξυλομάδες. Το σάκχαρο μπορεί να συνδέεται και με έναν αρωματικό άνθρακα όπως επίσης και με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες,

λιπίδια και άλλες φαινόλες. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κύριες διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων τα οποία δεσμεύουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι πολυφαινόλες είναι γλυκοσυλιωμένες ή/και ακετυλιωμένες ενώσεις.

Κατηγορίες

α) Φλαβονοειδή

Αποτελούν την μεγαλύτερη υποομάδα πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της *αντικαρκινικής τους δράσης*. Περιέχονται στο τσάι, τον καφέ, το κακάο, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο κ.α.

β) Φαινολικά οξέα

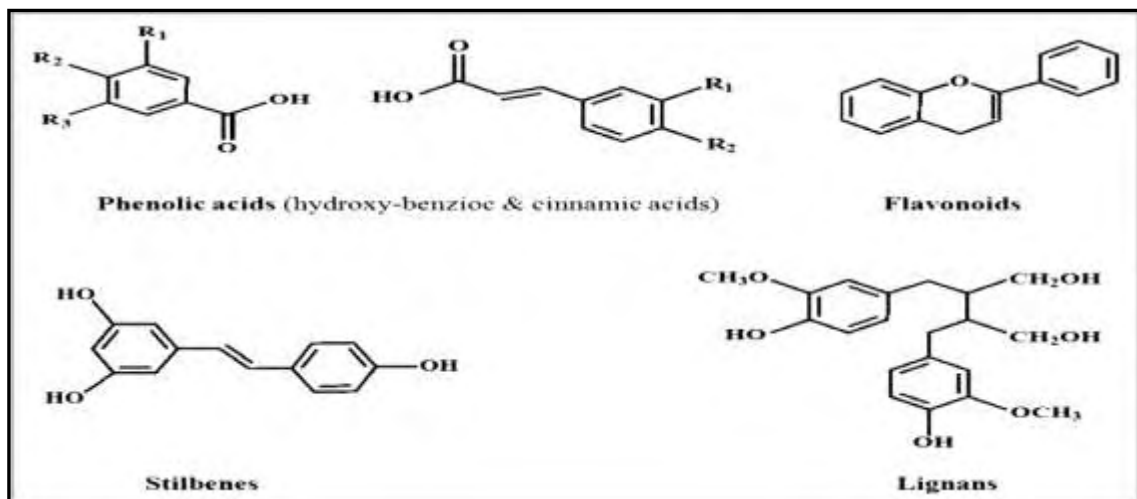
Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιίικες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα από τροφές που μας παρέχουν φαινολικά οξέα: μήλα, κεράσια, ακτινίδια, φράουλες, κρεμμύδια, καφές, κόκκινο κρασί, βρώμη, ρύζι κ.α.

γ) Ανθοκυανίνες

Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις *καρδιαγγειακές νόσους*. Πρόκειται για χρωστικές που δίνουν το λαμπρό κόκκινο, μπλε και μοβ χρώμα στα ρόδια, τα σταφύλια, τα κόκκινα κρεμμύδια και τα μπλε μούρα.

δ) Στιλβένια

Με πιο γνωστή την ***Ρεσβερατρόλη***. Ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση κατά του Αλτσχάιμερ, των καρδιαγγειακών νόσων, της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών, στο κρασί και σε άλλες φυτικές ουσίες.



Εικόνα 1: Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων

1.1.2 Χημειοπροστατευτική Ικανότητα Των Πολυφαινολών

Με τον όρο χημειοπροστασία αναφερόμαστε στη χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων. Όπως έγινε σαφές και παραπάνω, οι διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις έχουν χημειοπροστατευτική δράση η οποία οφείλεται κυρίως στα φυτοχημικά τους συστατικά. Πρόκειται για μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού, η γονιδιακή ρύθμιση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση και δρουν ως αντιοξειδωτικά, ενώ θεωρούνται φυτοοιστρογόνα, γιατί έχουν παρόμοια δράση με τις ορμόνες. Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, του χρώματος και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

1.2 Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβίων (ΥΑΕ)

1.2.1 Συστατικά ΥΑΕ

Το κύριο προϊόν της ελαιουργίας είναι το ελαιόλαδο διαφόρων κατηγοριών, δευτερεύοντα προϊόντα αποτελούν τα φυτικά υγρά και η ελαιοπυρήνη. Τα φυτικά υγρά γνωστά και ως λιοζούμια ή κασιγάρος παρόλο που δεν έχουν εμπορική αξία περιέχουν πολύτιμα συστατικά (σάκχαρα, πρωτεΐνες σε μικρότερο βαθμό, υπολλείματα λαδιού, φαινολικές ουσίες, χρωστικές και κυρίως χλωροφύλλες). Ανάκτηση ορισμένων από αυτά τα συστατικά γίνεται συμπτωματικά κατά την

εφαρμογή ορισμένων τεχνικών ορθολογικής διαχείρισης του κασιόγαρου. Αντίθετα, η ελαιοπυρήνη έχει εμπορική σημασία, διότι περιέχει αυξημένα ποσοστά ελαιόλαδου και είναι πρώτη ύλη για τα πυρηνελαιουργεία. Τα δευτερεύοντα προϊόντα όταν είναι τελείως άχρηστα καλούνται απόβλητα, όταν από την άλλη αποτελούν αντικείμενο περαιτέρω επεξεργασίας, αποκαλούνται υποπροϊόντα. Τα φυτικά υγρά απόβλητα είναι σκοτεινού χρώματος με χαρακτηριστική οσμή και σύμφωνα με τα περιορισμένα διαθέσιμα στοιχεία παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλούς δείκτες ρύπανσης (BOD₅, COD, αιωρούμενα στερεά). Από τα συστατικά που περιέχονται στον κασιόγαρο, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ από την άλλη είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό.

1.2.2 Χαρακτηριστικά Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβίων

Στις μεσογειακές χώρες η συνολική ποσότητα παραγωγής υγρών αποβλήτων ξεπερνά τα 30 εκατομμύρια κυβικών μέτρων κάθε χρόνο. Στην Ελλάδα η συνολική παραγωγή υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι περίπου 1.5 εκατομμύριο κυβικά μέτρα ετησίως, αφού υπάρχουν γύρω στα 2.500 ελαιοτριβεία σε ολόκληρη την Ελλάδα. Τα υγρά απόβλητα των ελαιοουργείων αποτελούν πηγή ρύπανσης των εδαφών και των υδάτινων πόρων εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που έχουν. Τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

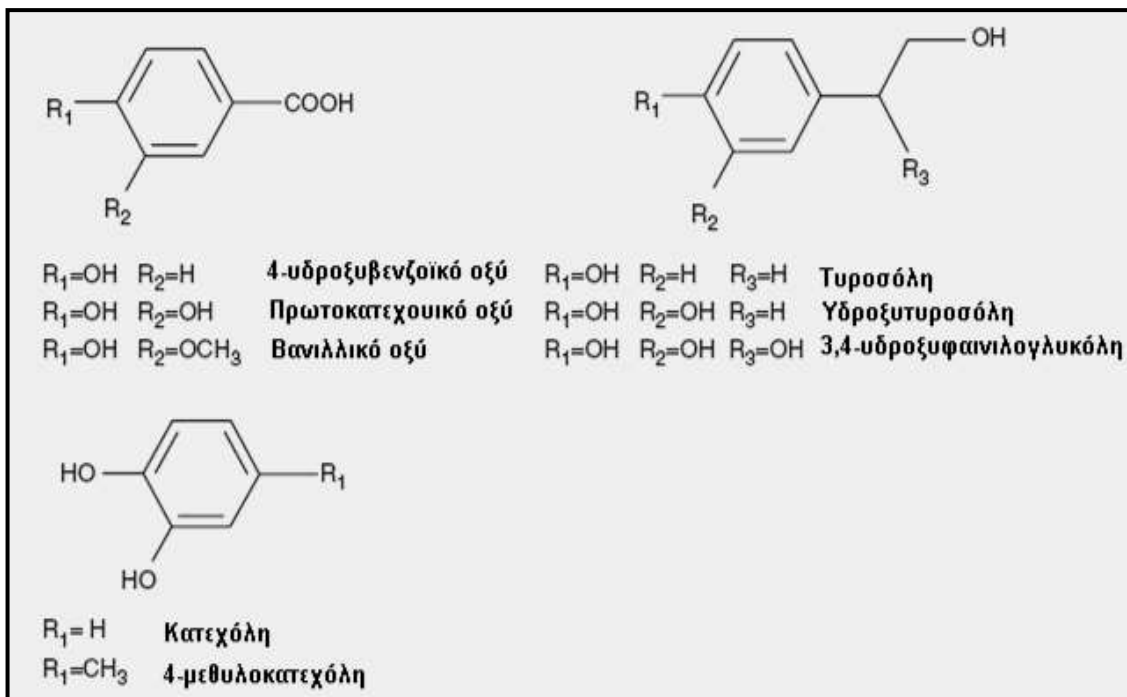
- Έντονο σκούρο καφέ έως σχεδόν μαύρο χρώμα
- Έντονο χαρακτηριστικό άρωμα
- Υψηλό οργανικό φορτίο, όπου μέρος αυτού είναι δύσκολα αποικοδομήσιμο με την αναλογία COD/BOD₅ να κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 5
- pH που κυμαίνεται από 3 έως 6 (ελαφρώς όξινο)
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Υψηλό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες
- Υψηλό περιεχόμενο σε στερεή ύλη

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου ανήκουν στη κατηγορία των γεωργικών αποβλήτων. Επηρεάζονται από κάποιους παράγοντες για αυτό το λόγο υπάρχει ένα εύρος των τιμών των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν τη σύσταση του κασίγαρου.

- Ποικιλία των ελιών
- Ηλικία ωρίμανσης των καρπών των ελαιόδεντρων
- Κλιματολογικές συνθήκες
- Τύπο του εδάφους
- Τύπο της τεχνολογίας παραγωγής και τρόπος διαχωρισμού ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη.
- Χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων
- Χρόνο συγκομιδής και αποθήκευσης πριν την επεξεργασία.

1.2.3 Πολυφαινόλες των ΥΑΕ

Τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις των 0,5-24 g/l και αυτό εξαρτάται από την διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή ελαιόλαδου. Γενικά περιλαμβάνουν ένα εύρος οργανικών ενώσεων, οι οποίες έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά που έχουν προσδιοριστεί ποιοτικά και ποσοτικά στα ΥΑΕ περιλαμβάνουν τα **φαινυλοοξέα**, τις **φαινυλαλκοόλες**, τα **σεκοϊριδοειδή** και τα **φλαβονοειδή**. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν πρόχειρα να καταταγούν σε 2 γενικές κατηγορίες. Τα φαινολικά συστατικά της πρώτης ομάδας περιλαμβάνουν απλές φαινολικές ενώσεις, μη αυτοοξειδούμενες ταννίνες και τα φλαβονοειδή. Η δεύτερη ομάδα περιέχει τα σκουρόχρωμα πολυμερή που προέρχονται από την αυτοοξείδωση των φαινολικών συστατικών της πρώτης ομάδας. Το χρώμα των ΥΑΕ εξαρτάται από την αναλογία των 2 ομάδων πολυφαινολών.



Εικόνα 2: Παραδείγματα πολυφαινολικών ενώσεων των Υ.Α.Ε.

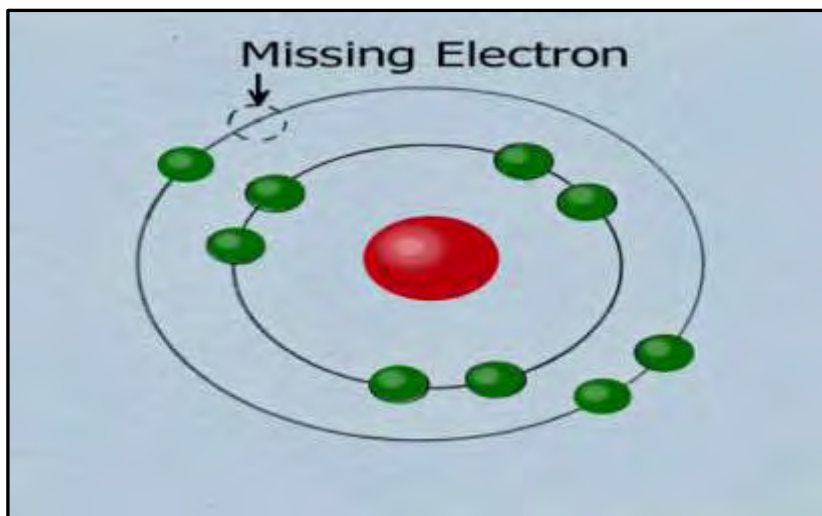
1.3 Οξειδωτικό Στρες

1.3.1. Ελεύθερες Ρίζες

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.

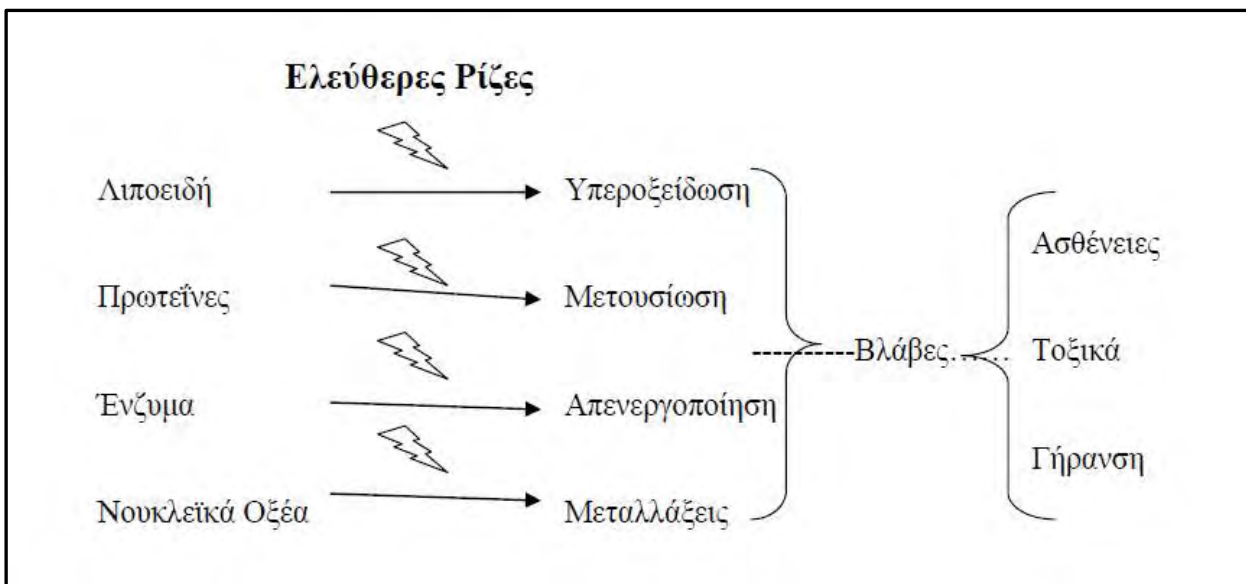
Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις.

Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό.



Εικόνα 3: Ασταθές μόριο

Πρώτος ο Denham Harman το 1956 πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και αργότερα έθεσε ως αξίωμα ότι αυτά τα συστατικά έχουν ρόλο στην γήρανση μέσω πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA και μιτοχονδριακό DNA. Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού. Απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, τα οποία αποτελούν για το κύτταρο, το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας. Στα κυτταρικά αυτά οργανίδια λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών. Είναι μόρια με ένα **ασύζευκτο**, υψηλά ενεργό, ηλεκτρόνιο στα εξωτερικά τους τροχιακά. Επομένως πρόκειται για ασταθή μόρια που εμφανίζουν μεγάλη ενεργειακή κατάσταση. Για να εξισορροπήσουν την δομή τους, αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινούν μια καταστρεπτικά ενεργή αλυσίδα και να προκαλούν έτσι βλάβη σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές δομές (πρωτεΐνες, κυτταρική μεμβράνη, DNA).



Εικόνα 4: Βλάβες των βιολογικών μορίων λόγω δράσης ελεύθερων ριζών

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι τα μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται ως υποπροϊόντα, κατά την διάρκεια παραγωγής ενέργειας με την χρησιμοποίηση οξυγόνου στα μιτοχόνδρια του ανθρώπου.

1.3.2 Δραστικά Είδη O_2

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.

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) (Gutteridge, 1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil *et al.*, 2012; Vainio *et al.*, 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

<u>ΔΜΟ</u>	<u>Μοριακός τύπος</u>
Ανιόν σουπεροξειδίου	O_2^-
Υδροπεροξειδική ρίζα	$HOO\cdot$
Ρίζα υδροξυλίου	$OH\cdot$
Ρίζα Αλκοξειδίου	$RO\cdot$
Ρίζα υπεροξειδίου	$ROO\cdot$
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2
Οργανικά υδροπεροξείδια	$ROOH$
Μονήρες οξυγόνο	1O_2
Όζον	O^3
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$
Περοξυνιτρώδες	$ONOO^-$

Πίνακας 1: Κυριότερα είδη ΔΕΟ

1.3.3. Σχηματισμός Ελεύθερων Ριζών

Η πλειονότητα των ελευθέρων ριζών παράγεται από τον 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.*, 2006; Ibiebele *et al.*, 2013; Niclis *et al.*, 2011; Lin & Cai, 2012; Cicerale *et al.*, 2009; Vainio *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2008).

Διάφορες διαδικασίες κατά τις οποίες παράγονται ελεύθερες ρίζες είναι οι παρακάτω:

α) όταν υπάρχει αυξημένη ανάγκη για αποτοξίνωση (π.χ υπερβολική έκθεση οργανισμού σε τοξικές ουσίες),

β) όταν υπάρχει αυξημένη παραγωγή ενέργειας (υπερβολική κατανάλωση θερμίδων και ιδιαίτερα λίπους και «κενών» θερμίδων),

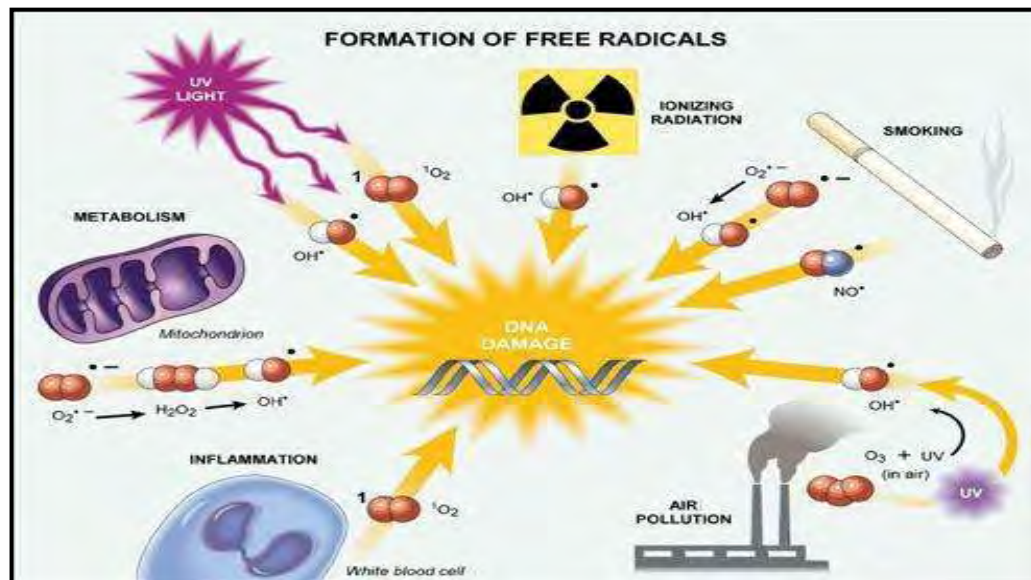
γ) όταν υπάρχει παρατεταμένη ανοσολογική απάντηση,

δ) όταν υπάρχει αυξημένη παραγωγή στεροειδών (π.χ σε καταστάσεις στρες – όπως η έντονη φυσική δραστηριότητα-, εφηβεία, διαταραχές εμμήνου ρύσεως κ.ά.)

ε) έπειτα από έκθεση οργανισμού σε συντηρητικά τροφίμων και μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. καπνός τσιγάρου, ρύποι που μολύνουν την ατμόσφαιρα)

στ) κατά την έκθεση σε ακτινοβολία (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία UV) και κατά την αυτοοξειδωση διαφόρων χημικών ουσιών και βιομορίων (π.χ. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα).

ζ) κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση (δηλ. επίδραση ελευθέρων ριζών επί των λιπιδίων που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων και ιδιαίτερα των πολυακόρεστων, επειδή περιέχουν πολλαπλούς διπλούς δεσμούς μεταξύ των οποίων βρίσκονται γέφυρες μεθυλενίου (-CH₂-) που διαθέτουν αντιδραστικά υδρογόνα., με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υπεροξειδίων.



Εικόνα 5: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

1.3.4 Πως Εξουδετερώνονται 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 αντιοξειδωτική 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 & Ross, 2012; Giaginis & Theocharis, 2011; Lin & Cai, 2012; Bozkurt *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2012; AICR, 2007).

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

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

Επίσης είναι δυνατόν, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C), να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση (AICR, 2007; Khalluki *et al.*, 2003).

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS)

και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; AICR, 2007).

Το οξειδωτικό στρες **προκαλείται** συνήθως από:

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

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

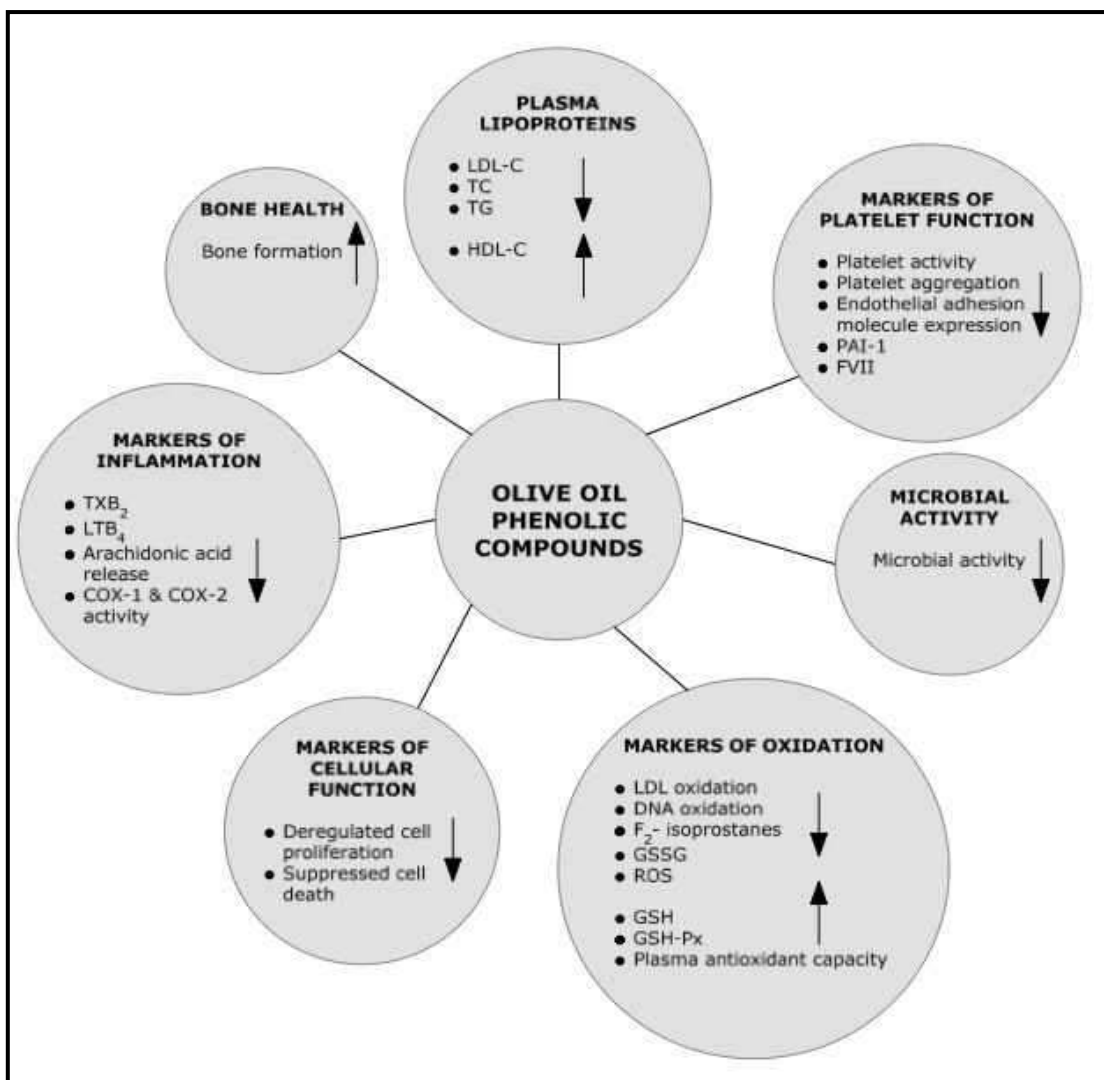
1.3.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

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

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε, οι ελεύθερες ρίζες ευθύνονται για την πρόκληση και εμφάνιση πολλών ασθενειών, με το κατάλογο αυτών συνεχώς να αυξάνεται (Halliwell, 1994).

1.4 Προστατευτικός Ρόλος των Πολυφαινολών από Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε)

Πλήθος ερευνών - μελετών, υποστηρίζουν την άποψη πως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατά συνέπεια στα απόβλητά του, είναι ικανές να δράσουν ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά.



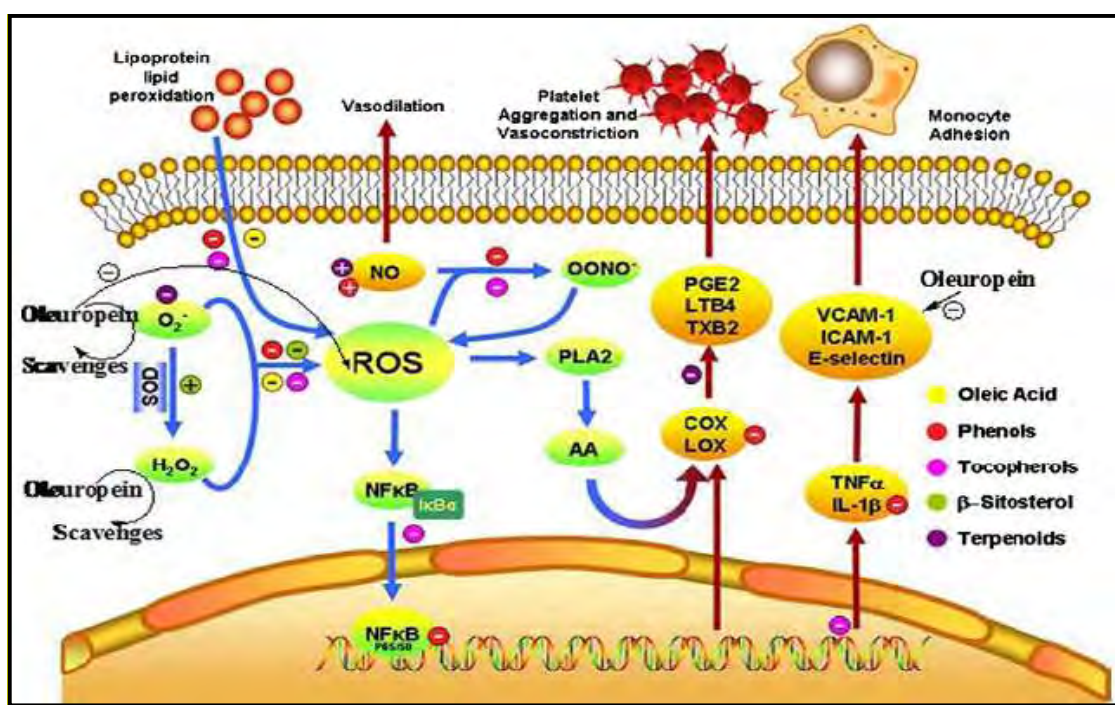
Εικόνα 6: Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale et.al., 2010).

Παρακάτω, οι μελέτες παρουσιάζονται ανάλογα με την συγκεκριμένη – στοχευμένη βιοδραστικότητα.

1.4.1 Καρδιαγγειακό.

1) Τα αποτελέσματα μιας μελέτης της επίδρασης των πολυφαινόλων του ελαιολάδου, στα αντισώματα, κατά της οξειδωμένης LDL – *Low Density Lipoprotein*, έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, προωθούν την δημιουργία OLAB (OxLDL autoantibodies – Αυτοαντισώματα της οξειδωμένης LDL). Καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, σε υψηλές συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL. (Castaner O., et al., 2011).

2) Καρδιοπροστατευτικός και νευροπροστατευτικός ρόλος της ελευρωπαΐνης στο ελαιόλαδο. (Syed Haris Omar. 2010).



Εικόνα 7: Προτεινόμενο μοντέλο για τους μηχανισμούς δράσης της ελευρωπαΐνης του ελαϊκού οξέως και άλλων ενώσεων του ελαιολάδου, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία

Η μελέτη υποστηρίζει πως το ελαϊκό οξύ, η ελευρωπαΐνη και η β-σιτοστερόλη (φυτική στερόλη), ενδέχεται ενδοκυτταρικά, να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Η απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και των νιτρικών μονοξειδίων NO^{\cdot} , καθώς επίσης και η μείωση του σχηματισμού των νιτρικών ιόντων NO_3^- , είναι οι λόγοι που οι συγκεκριμένες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου έχουν

καρδιοπροστατευτικό και νευροπροστατευτικό ρόλο.

3) Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου καταστέλλουν την προσκόλληση της ομοκυστεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανεξάρτητα από την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση (Manna, et.al. 2009).

4) Επιδράσεις της 3,4-DHPEA-EDA (3,4 -Διδροξυτυροσόλη) του ελαιολάδου, στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων (Paiva - Martins et.al, 2009).

5) Η προστατευτική δράση του ελαιολάδου και των φαινολικών του συστατικών, κατά της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Fito et.al. 2000).

6) Αντιθρομβωτικές δυνατότητες του ελαιολάδου σε κουνέλια με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. (De La Cruz, et.al. 2000).

7) Αναστολή των λευκοκυττάρων 5-λιποξυγενάσης από τις φαινόλες υδροξυτυροσόλη, καφεϊκό οξύ, ελευρωπαΐνη και τυροσόλη του ελαιολάδου (de la Puerta, et.al. 1999).

8) Αναστολή της δραστηριότητας της αραχιδονικής λιποξυγενάσης, από την υδροξυτυροσόλη, ένα φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου. (Kohyama, et.al, 1997).

1.4.2 Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα.

1) Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου (ελευρωπαΐνη, τυροσόλη και η διαλδεϊκή μορφή του δεκαρβοξυμέθουλου ελανολικού οξέως), έχουν μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση ακόμη μεγαλύτερη από εκείνη των άλλων φαινολικών ενώσεων των τροφίμων ή των συνθετικών βιοκτόνων.(Medina, et.al. 2009).

2) Ο αντι-ϊικός μηχανισμός της υδροξυτυροσόλης, στον ιο της γρίπης, φαίνεται να εμπλέκεται στην μορφολογική αλλαγή του ιού. (Yamada, et.al. 2009).

3) Αντιβακτηριακές πολυφαινόλες από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Carasso, et.al. 1995). Η μελέτη έγινε σε φυτοπαθογόνα Gram-αρνητικά (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*) και Gram-θετικά (*Corynebacterium michiganense*) βακτήρια.

1.4.3 Καρκίνος

Σε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων ελευρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης από το ελαιόλαδο παρατηρήθηκε ότι μείωσαν την εκφύλιση των ενδοθηλιακών κυττάρων (ποροειδείς αυλοί). (Scoditti, 2012).

Πολλές ακόμα *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα διαιτητικά φλαβονοειδή μπορούν να προστατεύουν το DNA από βλάβες που μπορεί να προκληθούν από ελεύθερες ρίζες μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού από την άμεση εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών. Αποτελέσματα από μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να μειώσουν τη συχνότητα εμφάνισης μονού σπασίματος στη διπλή έλικα του DNA, καθώς και την πρόκληση μόνιμης βλάβης μέσω ταχέων χημικών επισκευών.

Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχει εξετάσει πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν (Stagos et al., 2012). Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos et al., 2007; Spanou et al. 2007), με αποτέλεσμα αυτά τα εκχυλίσματα να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Τέλος, επηρέαζαν τη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou et al., 2012; Spanou et al., 2008).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

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

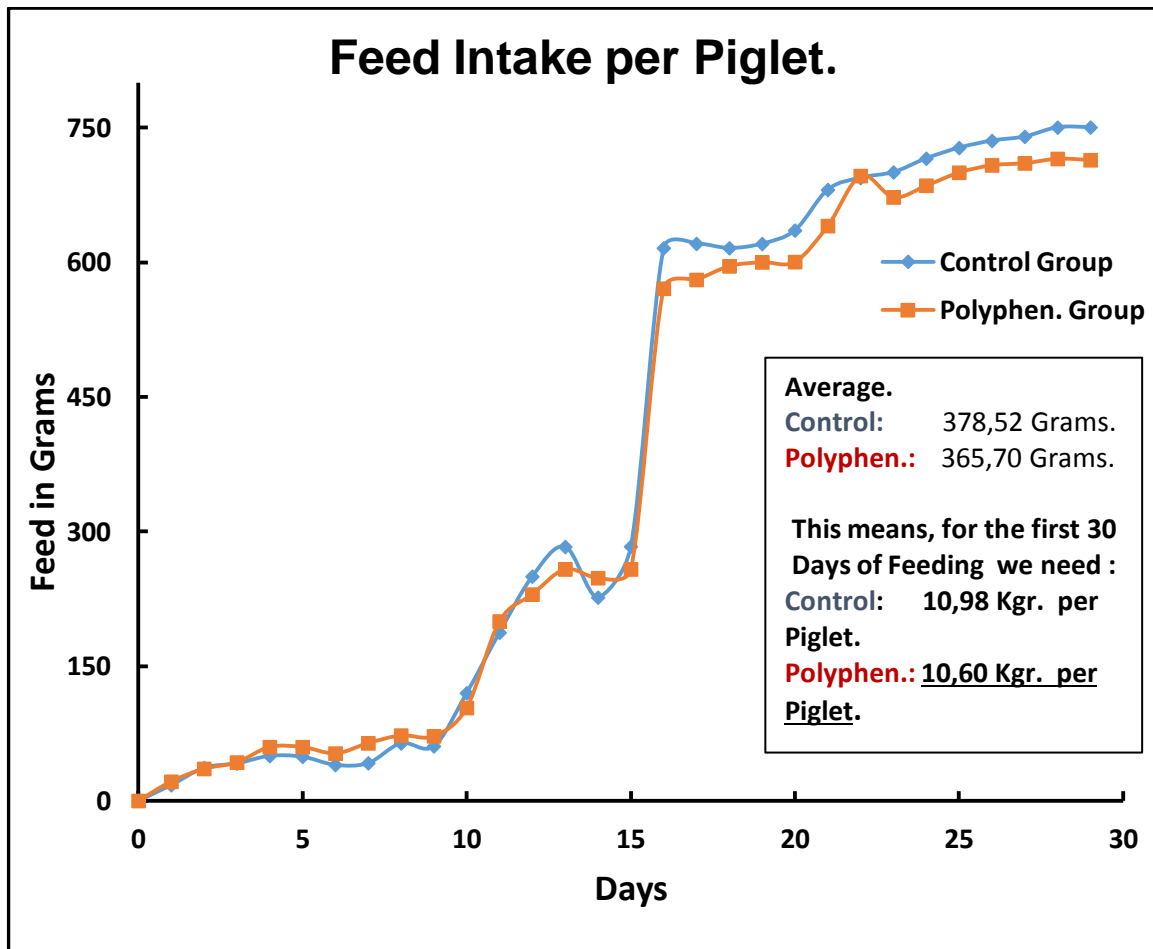
- Εκτροφή χοιριδίων (Εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης – ανάπτυξης).

Γεννήθηκαν είκοσι έξι (26) νεαρά χοιρίδια από δύο (2) χοιρομητέρες. Το γενετικό υπόβαθρο των χοιρομητέρων προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X Large White – Duroc – Pietrain (πατέρας). Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο ο τρόπος θανάτωσης τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

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

Είκοσι (20) ημέρες από την γέννησή τους, ξεκίνησε ο απογαλακτισμός τους και τα εικοσιδύο (22) εναπομείναντα χοιρίδια, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, εκ των οποίων έντεκα (11) αποτέλεσαν την ομάδα Α (ελέγχου) και τα υπόλοιπα έντεκα (11) την ομάδα Β, όπου στο σιτηρέσιό της υπήρχαν πολυφαινολικά πρόσθετα.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του απογαλακτισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους σε διαφορετικά κελιά για χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη βδομάδα του απογαλακτισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες. Η απομάκρυνση των χοιρομητέρων έγινε 35 μέρες μετά την γέννηση τους. Στο διάγραμμα 1 φαίνεται η ημερήσια κατανάλωση στα σιτηρέσια απογαλακτισμού.



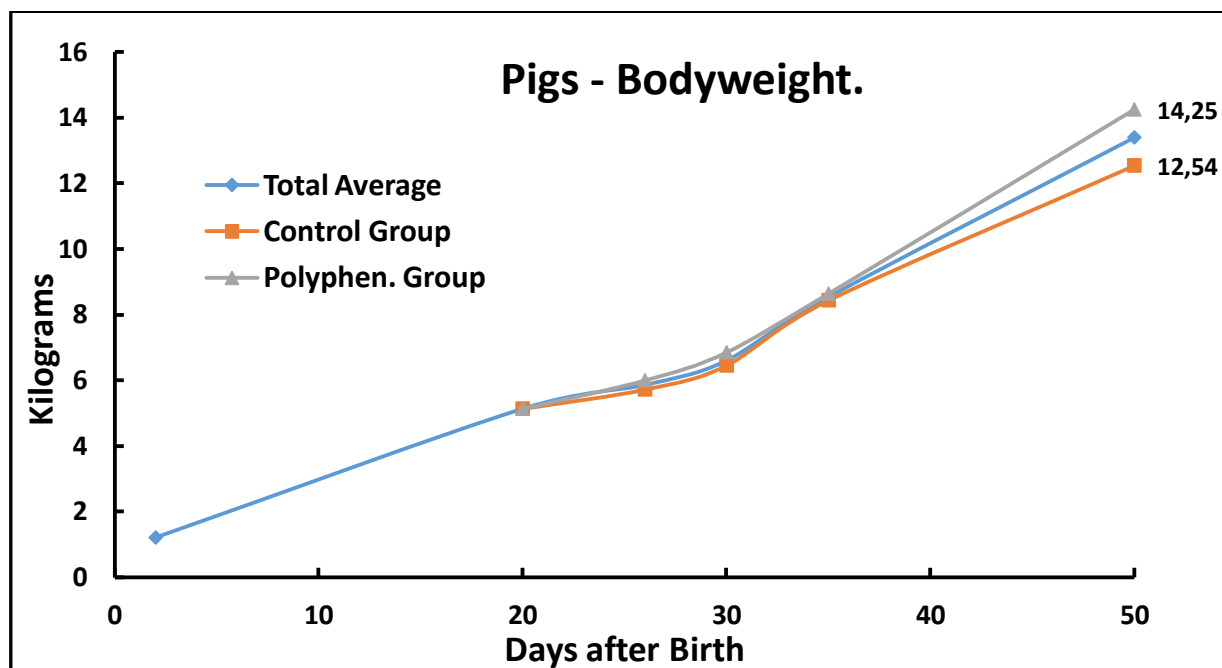
Διάγραμμα 3: Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου από την Εικοστή Μέρα της Γέννησης Μέχρι την Πεντηκοστή

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

Εκτός από την ημερήσια μέτρηση της κατανάλωσης σιτηρεσίου, γινόταν και μετρήσεις στα βάρη των χοίρων. Στο διάγραμμα 2 φαίνεται η αύξηση στα βάρη των χοίρων με το πέρασμα των ημερών και μέχρι το τέλος του πειράματος.

Ημέρες μετά την γέννηση	Μέσος Όρος	Contol	Polyph.
2	1,207	-	-
20	5,131	5,131	5,131
26	5,859	5,720	5,999
30	6,600	6,450	6,850
35	8,537	8,434	8,640
50	13,395	12,540	14,250

Πίνακας 2: Μέσος Όρος Μέτρησης Βάρους των Χοιριδίων



Διάγραμμα 4: Αύξηση στα Βάρη των Χοίρων σε Σχέση με το Χρόνο

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι κατά μέσο όρο το βάρος των γουρουνιών που ανήκαν στην πολυφαινολική ομάδα παρουσιάζεται κατά 1,7 χιλιόγραμμα αυξημένο από αυτό της ομάδας ελέγχου, στις 50 ημέρες μετά την γέννησή τους, παρότι κατανάλωσαν κατά μέσο όρο 380 γραμμάρια σιτηρεσίου λιγότερο από αυτό της ομάδας ελέγχου.

Εκτέλεση τεσσάρων (4) ιστοληψιών (σε 2, 20, 35 και 50 ημέρες μετά την γέννησή τους) 9 διαφορετικών ιστών στο Μικροσφαγείο που εδρεύει στο αγρόκτημα του ΤΕΙ/Θεσσαλίας. Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τον εγκεφαλικό, καρδιακό και ιστό σπλήνας. Η πρώτη ιστοληψία εκτελέστηκε σε δύο (2) χοιρίδια ηλικίας δύο (2) ημερών και βάρους 0,950 και 1,560 kg. Χρησιμοποιήθηκε το αναισθητικό φάρμακο Xyloran® (Vetoquinol S.A., France) για να διασφαλιστεί ότι προκαλείται ο ελάχιστος δυνατός αναπώφευκτος πόνος, ταλαιπωρία ή αγωνία (Οδηγίες 2010/63/ΕΕ) και η θανάτωση έγινε στην εγκατάσταση του εκτροφέα από αρμόδιο, εκπαιδευμένο πρόσωπο. Η δεύτερη ιστοληψία έγινε είκοσι (20) μέρες μετά την γέννηση σε δύο (2) χοιρίδια ημερών και βάρους 4,9 και 4,5 kg. Η τρίτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε τριάντα πέντε (35) μέρες από τη γέννηση τους σε δέκα (10) χοιρίδια, 5 από το πολυφαινολικό group και 5 από την ομάδα ελέγχου. Η τέταρτη ιστοληψία έγινε πενήντα (50) μέρες από τη γέννηση τους σε δώδεκα (12) χοιρίδια, 6 από το πολυφαινολικό group και 6 από την ομάδα ελέγχου.

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

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

2.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου

2.2.1 Εισαγωγή

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με ψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία ψηλής πεπτικότητας και ικανοποιητικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πιο κατάλληλα φυτά που προσφέρονται για ενσίρωση είναι το καλαμπόκι και η μηδική. Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε αρχικά να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι. Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι η διαδικασία

ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βακτήρια. Τα βακτήρια τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Αυτά που είναι επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα.

Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν να μετατρέψουν υδατανθράκες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων. Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

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

Φάση 1^η: Αερόβια Φάση

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

Φάση 2^η: Φάση Ζύμωσης

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

Φάση 3^η: Σταθερή Φάση

Όσο η είσοδος του αέρα στο αποθηκευμένο ενσίρωμα, λίγες μεταβολές συμβαίνουν. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φάσης 2 σιγά-σιγά μειώνονται σε αριθμούς. Μερικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξύ επιβιώνουν σε αυτή τη φάση σε μια σχεδόν ανενεργή κατάσταση, άλλοι, όπως clostridia και bacilli επιβιώνουν ως σπόρια. Μόνο μερικές πρωτεάσες και καρβουϋδράσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο οξύ και κάποιοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, όπως *Lactobacillus buchneri* συνεχίζουν να είναι ενεργοί σε χαμηλό επίπεδο.

Φάση 4^η : Αερόβια Φάση Αλλοίωσης

Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ενσιρώματος στην τροφή των ζώων αυτό είναι αναπόφευκτο, αλλά μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει νωρίτερα λόγω βλάβης του καλύμματος αποθήκευσης του ενσιρώματος. Η διαδικασία της αλλοίωσης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η έναρξη της φθοράς μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση των οργανικών οξέων, που συμβάλλουν στην διατήρηση, από ζύμες και περιστασιακά βακτήρια οξικού οξέος. Αυτό θα προκαλέσει μια αύξηση στο pH, και

ως εκ τούτου το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως βάκιλλοι, έχει ξεκινήσει. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ωστόσο, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

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

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

2.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σ'ακχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να

μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

2.2.3 Προετοιμασία Ενσιρώματος και Σιτηρεσίου των Χοίρων

Το κατακράτημα των επεξεργασμένων λυμάτων ελαιοτριβείων χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ενσιρώματος αραβοσίτου. Για το σκοπό αυτό, το καλαμπόκι αναμίχθηκε με το κατακράτημα σε αναλογία 24: 1. Έτσι, το ενσίρωμα που προήλθε περιείχε καλαμπόκι 56% στερεά, 4% στερεά κατακράτημα και 40% υγρά. Σε όλες της περιπτώσεις η ανάμιξη πραγματοποιήθηκε με γνώμονα την παραγωγή τελικού υλικού με στερεά 60% κ.β.

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

υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphen.), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραιώση του ενσιρώματος με αποσταγμένο νερό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

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

Πίνακας 3: Μέτρηση pH Ενσιρωμάτων

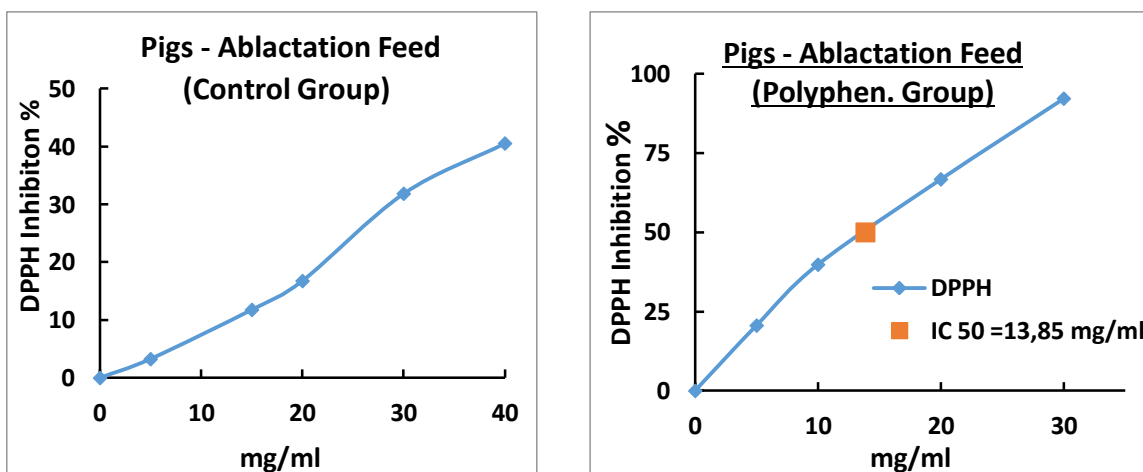
Τελικά, τα ενσιρώματα αναμίχθηκαν με άλλα υλικά και δημιουργήθηκε έτσι το τελικό σιτηρέσιο, όπως φαίνεται στον πίνακα (4).

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

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

Πίνακας 4: Σύσταση Σιτηρεσίων

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



Διάγραμμα 3: Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων

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

2.3 Ιστοληψία - Ομογενοποίηση Ιστών

Εκτελέστηκαν τέσσερις (4) ιστοληψίες, όταν τα χοιρίδια ήταν ηλικίας 2, 20,35 και 50 ημερών, τα οποία κατανάλωναν τα σιτηρέσια που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν (ομάδα ελέγχου ή πολυφαινολών). Η μεταφορά των ιστών έγινε σε erpendorf tubes των 2 ml σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση των ιστών (εγκεφαλικός, καρδιακός και ιστός σπλήνας), εκτελέστηκε με γουδί και γουδοχέρι και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCL, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα

μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH), όπως:

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

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



Εικόνα 8: Ομογενοποίηση Ιστών

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

2.4 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

2.4.1 Γενικά

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με

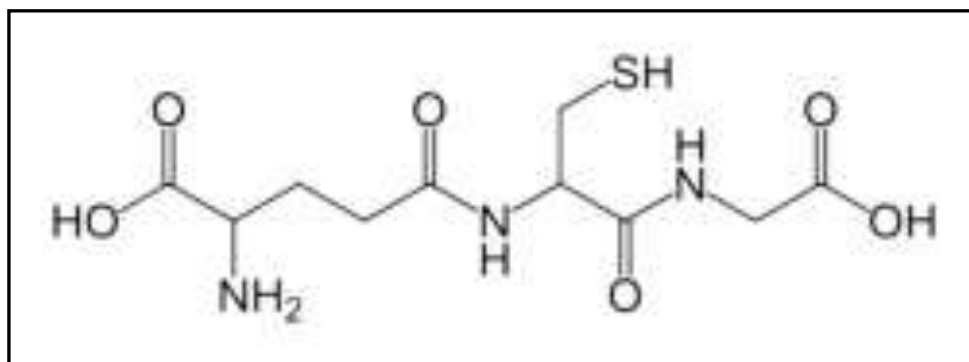
το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.4.2 Μέθοδοι

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

α. GSH στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστέινογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM (186). 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 αναγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).



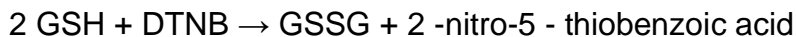
Εικόνα 9: Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειοτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών

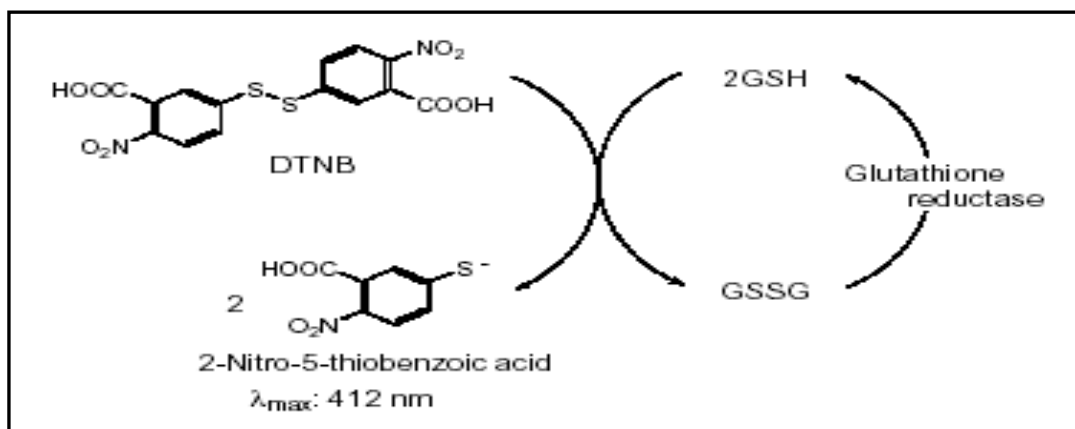
μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengupta et al., 2004).

α₁ Αρχή της Μεθόδου.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξειδωση της GSH από το διθειόδιο 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 την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 10: Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης

α₂ Αντιδραστήρια.

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε

475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

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

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

α₃ Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

Πίνακας 5: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH

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

α₄ Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) x 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 x 1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500

μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση (390 μL / 300 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

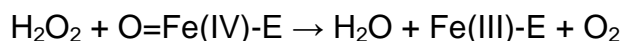
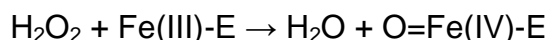
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10 x 2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι λαμβάνουμε την συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης. GSH (mmol/ g Hb).

β. Δραστικότητα της Καταλάσης

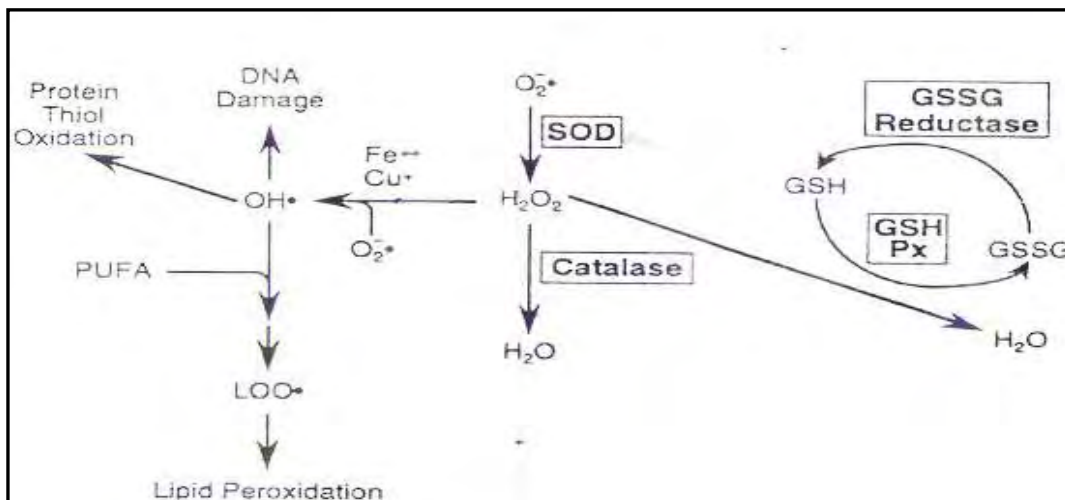
β₁ Αρχή της Μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Chelikani P, et. al., (2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H₂O₂ 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 τετρεμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη: 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 11: 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).

β₂. 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 (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

β₃. Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μL

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

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

β₄. Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta Abs_{\text{sample}} \text{ per min} / 40$) $\times (75 \times 1000 \times 2 \text{ ή } 3 \times 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

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

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

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

γ₁ Αρχή της Μεθόδου

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

γ₂ Αντιδραστήρια

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

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

• **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση. Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων

αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

γ₃ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

Πίνακας 7: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της TAC

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

γ₄ Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ % Abs μείωση = $(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$

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

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

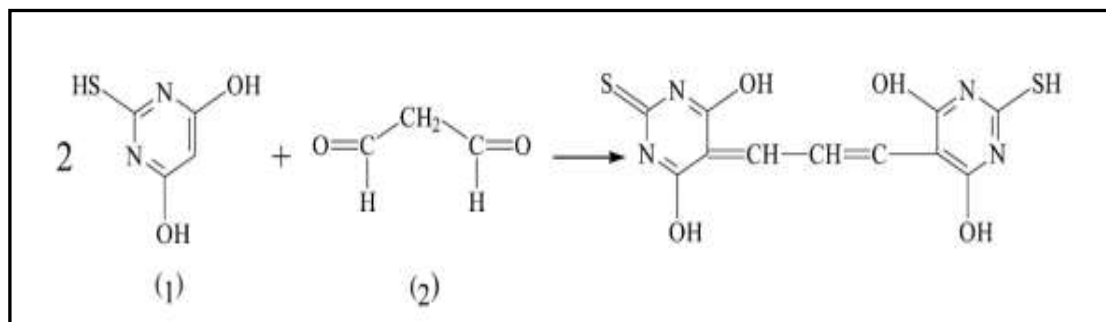
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5$ μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν / L πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH/L.

δ. Ουσίες που Αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

δ₁ Αρχή της Μεθόδου

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



Εικόνα 12: 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 Kelesetal., (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

δ₂ 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 gr Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

δ₃ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή αποσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1

mL σε erpendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

δ₄ Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (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 μmol/L.

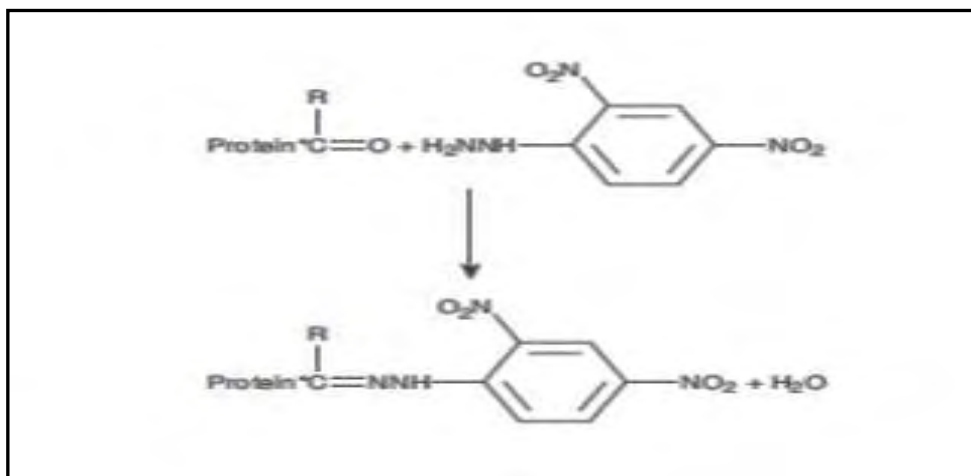
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

ε. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

ε₁ 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 ων 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.



Εικόνα 13: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που 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-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).

ε₂ Αντιδραστήρια

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

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

- **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 gr DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το

ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

ε₃ Πειραματικό Πρωτόκολλο

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

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

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

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

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους μοιπολικούς 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).

ε₄ Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50 \times 2$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος).

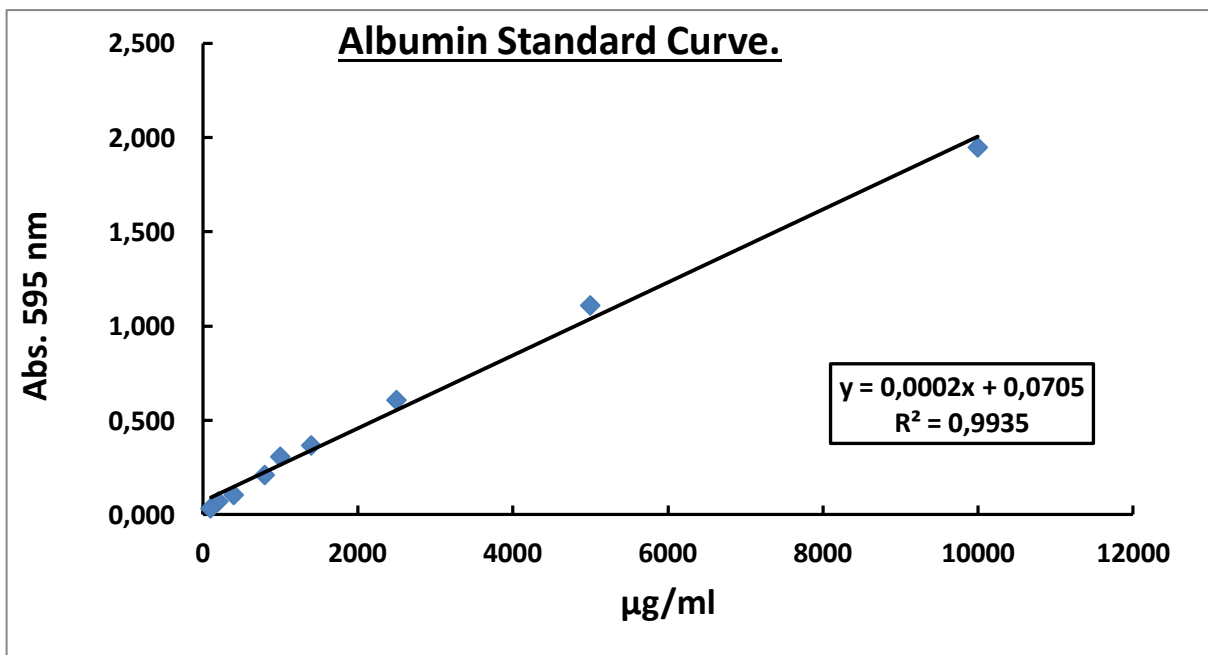
Επί 2 διότι προσθέτουμε (αραίωση 1/1 TCA 20% αρχικά).

2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Εγκεφαλικό , Καρδιακό και στον ιστό της Σπλήνας.

2.5.1.GSH

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

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



Διάγραμμα 4: Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης

2.5.2 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

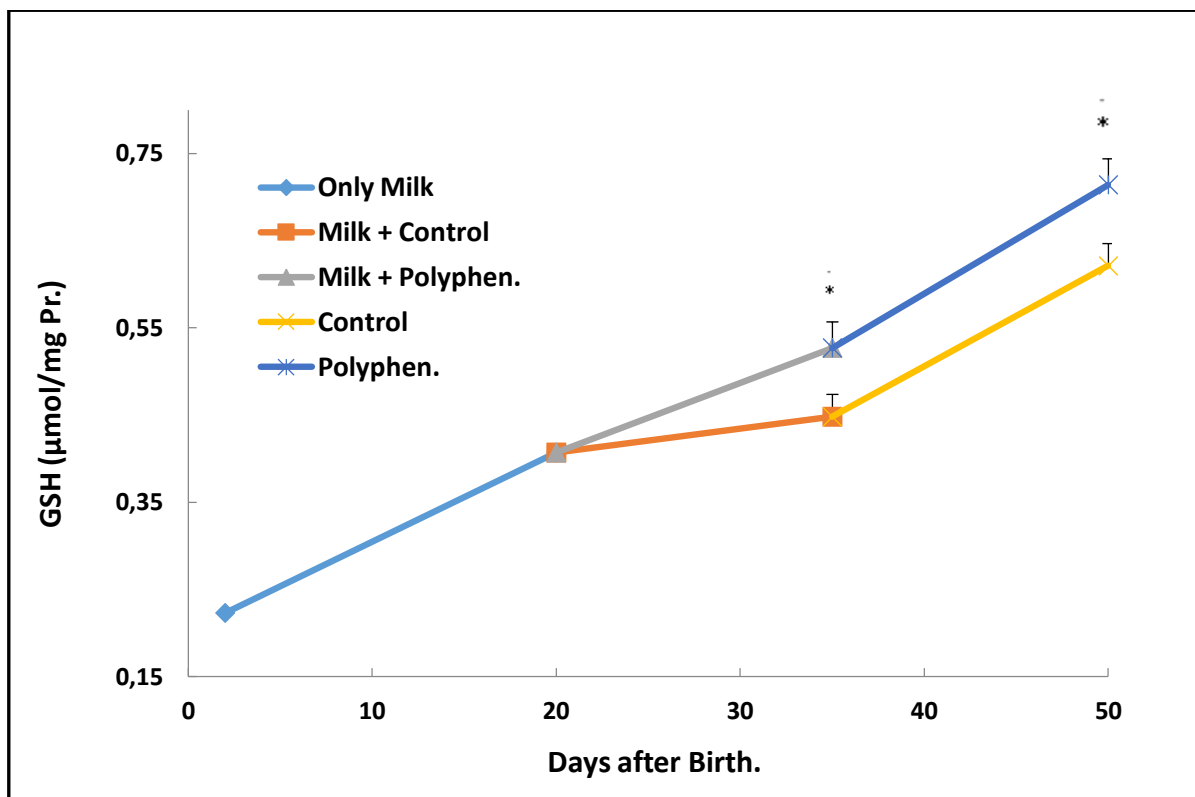
Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτήν του αίματος, πλην όμως αντί για 20 μl πλάσματος, τοποθετούμε στα προς μέτρηση δείγματα, 40 μl ομογενοποιημένου παγκρεατικού ή στομαχικού ιστού, αραιωμένου 1:3 με PBS.

2.5.3. TBARS – Καρβονύλια

Οι μετρήσεις των δύο παραπάνω δεικτών στον εγκεφαλικό, καρδιακό και στον ιστό της σπλήνας, εκτελέστηκαν ακριβώς όπως και στις μετρήσεις στο πλάσμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

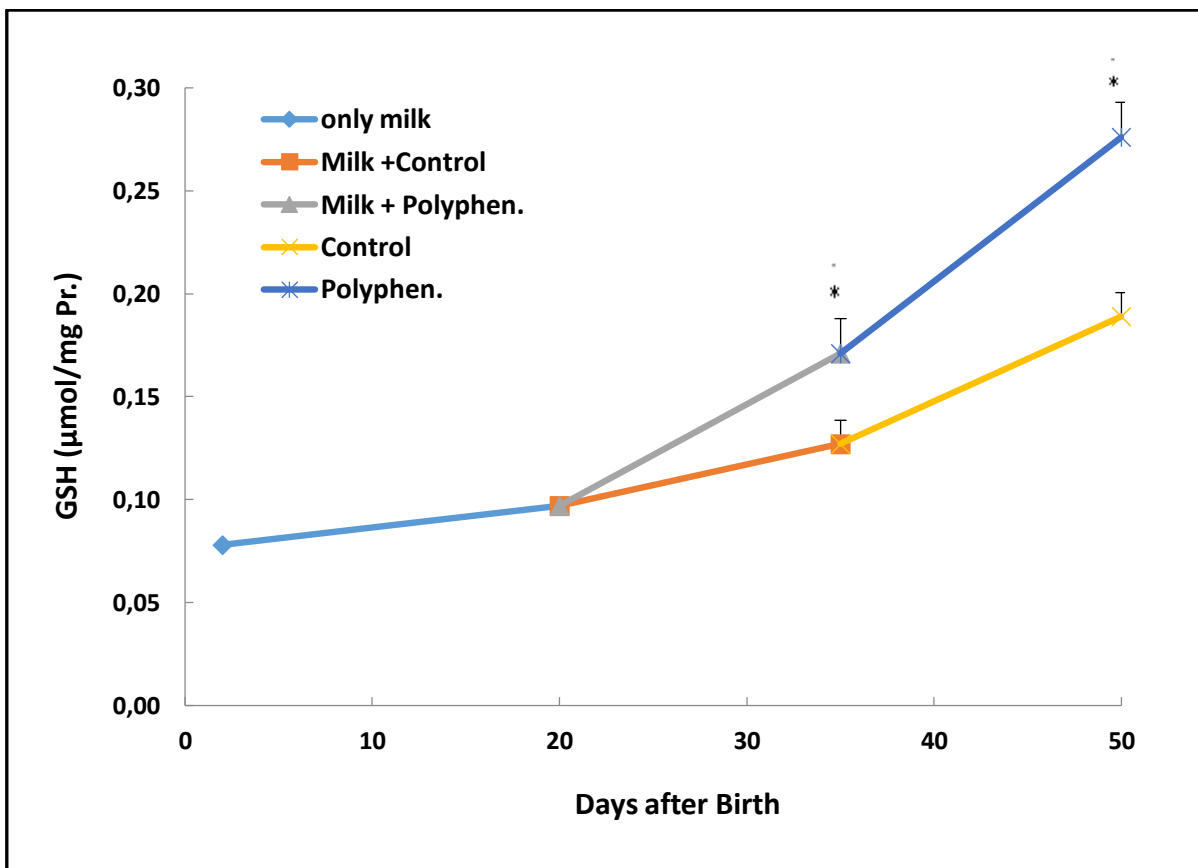
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $p < 0,05$.



Διάγραμμα 5: GSH στον Εγκεφαλικό Ιστό (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία)

Εγκεφαλικός ιστός	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα	17,63	14,98

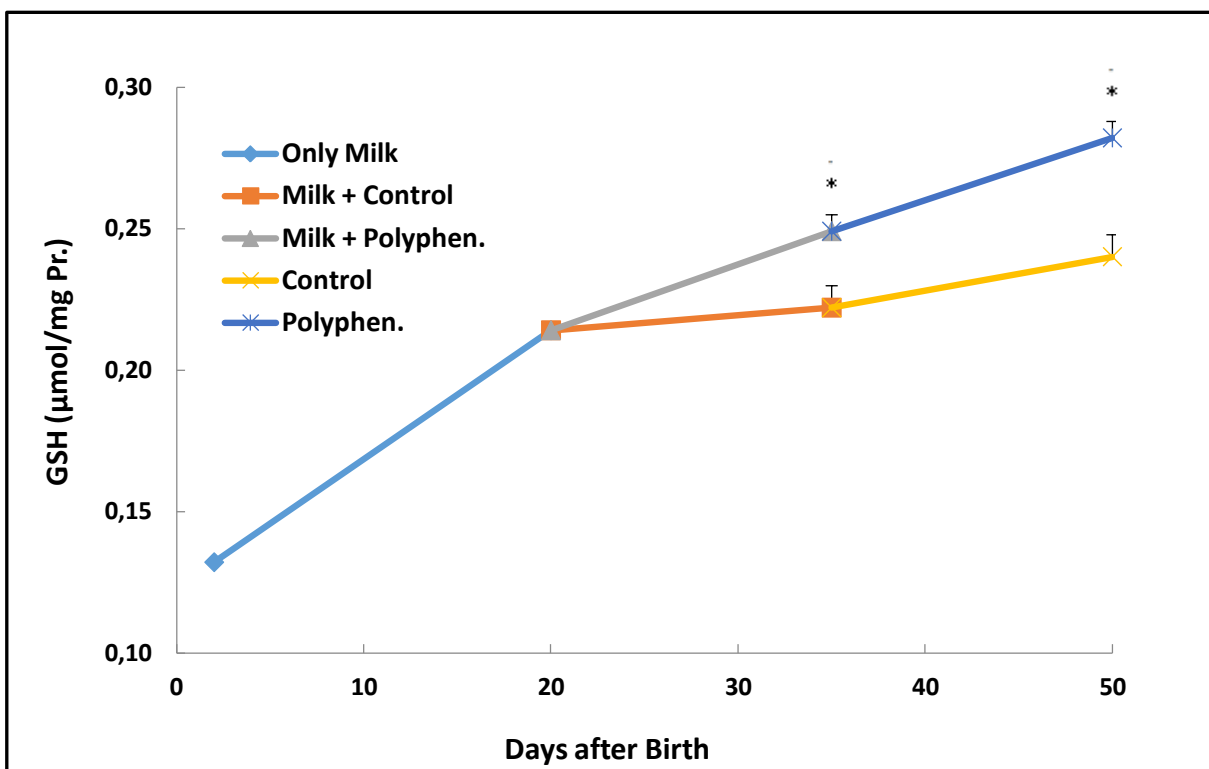
Πίνακας 8: Αύξηση GSH στον Εγκεφαλικό Ιστό της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου



Διάγραμμα 6: GSH στον Ιστό της Σπλήνας

Σπλήνα	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα	34,64	46,03

Πίνακας 9: Αύξηση GSH στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

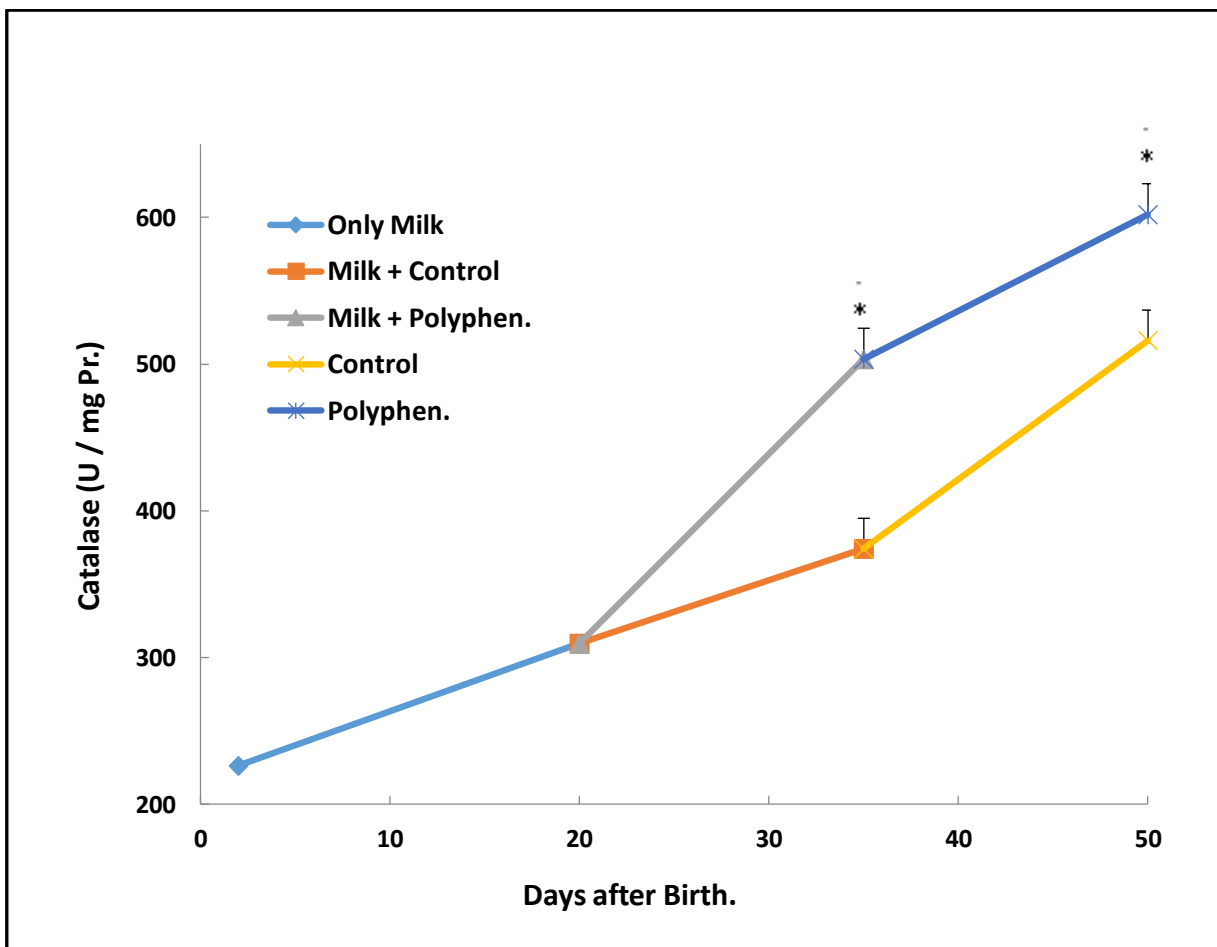


Διάγραμμα 7: GSH στον Καρδιακό Ιστό

Καρδιά	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα	12,16	17,50

Πίνακας 10: Αύξηση GSH στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

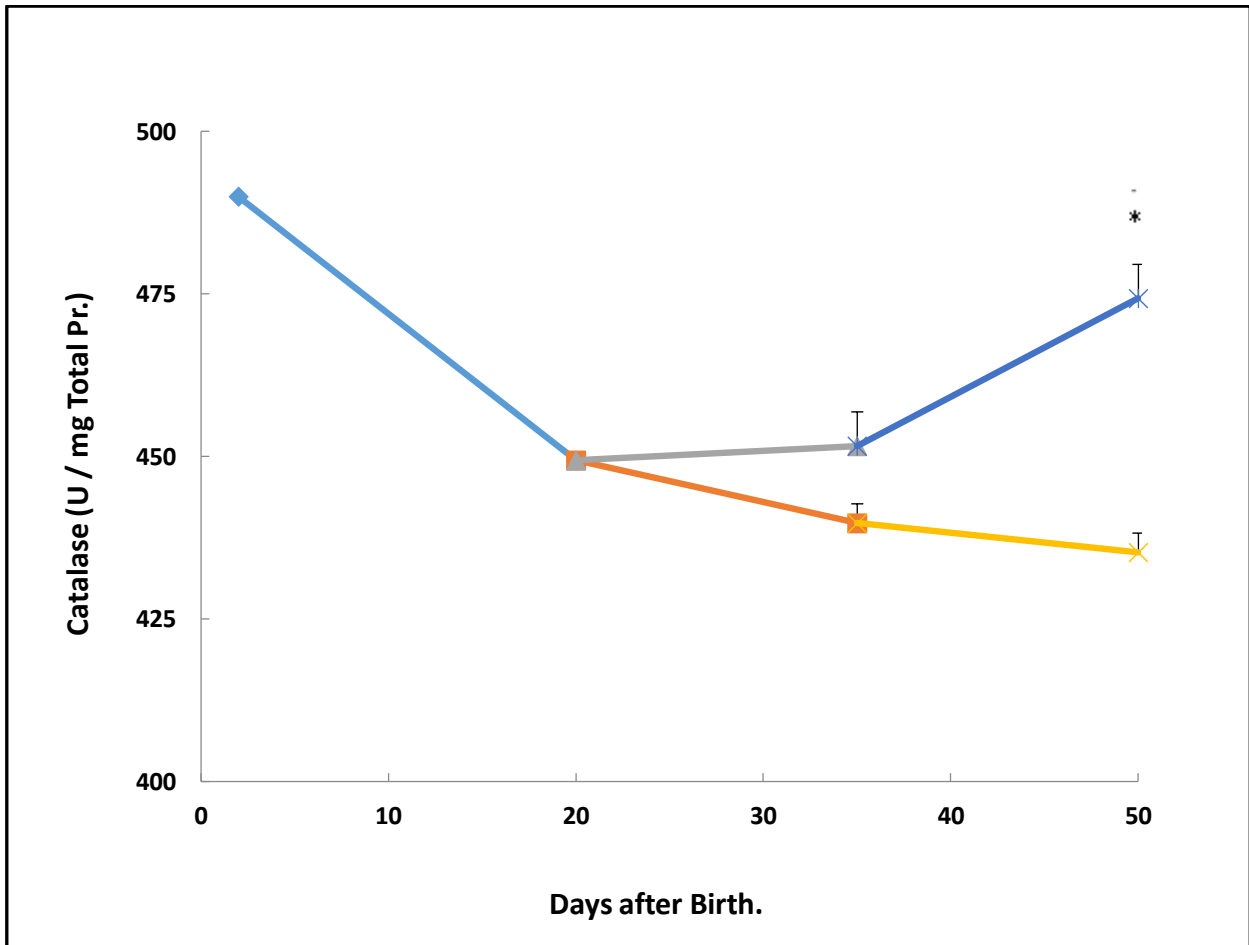
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της GSH στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση στις πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση και την χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου για τριάντα (30) ημέρες παρατηρείται στον ιστό της σπλήνας με 46,03 %, ακολουθεί η καρδιά με 17,50% και τέλος ο εγκεφαλικός ιστός με 14,98%.



Διάγραμμα 8: Καταλάση στον Εγκεφαλικό ιστό (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία)

Εγκέφαλος	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαιν. Ομάδα	34,36	19,55

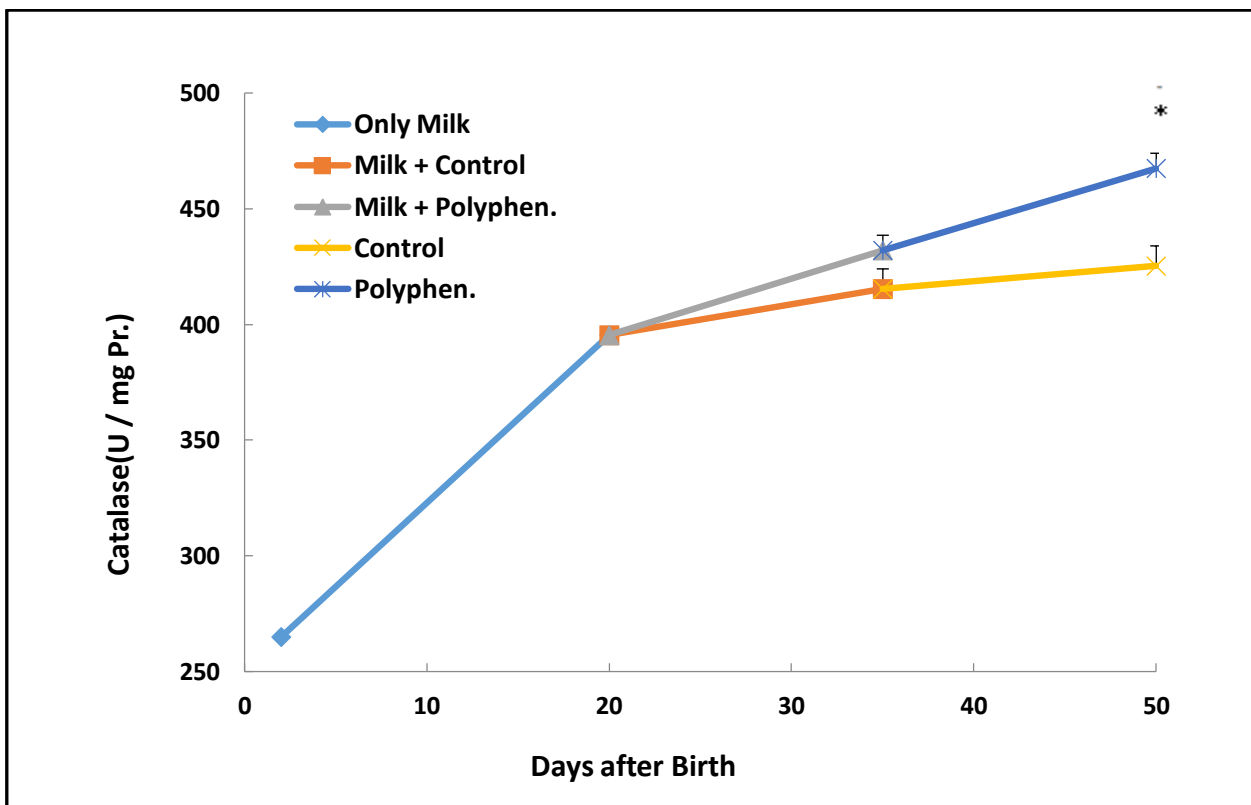
Πίνακας 11: Αύξηση Καταλάσης στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου



Διάγραμμα 9: Καταλάση στον Ιστό της Σπλήνας

Σπλήνα	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαινολική Ομάδα	2,73	8,98

Πίνακας 12: Αύξηση Καταλάσης στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχο

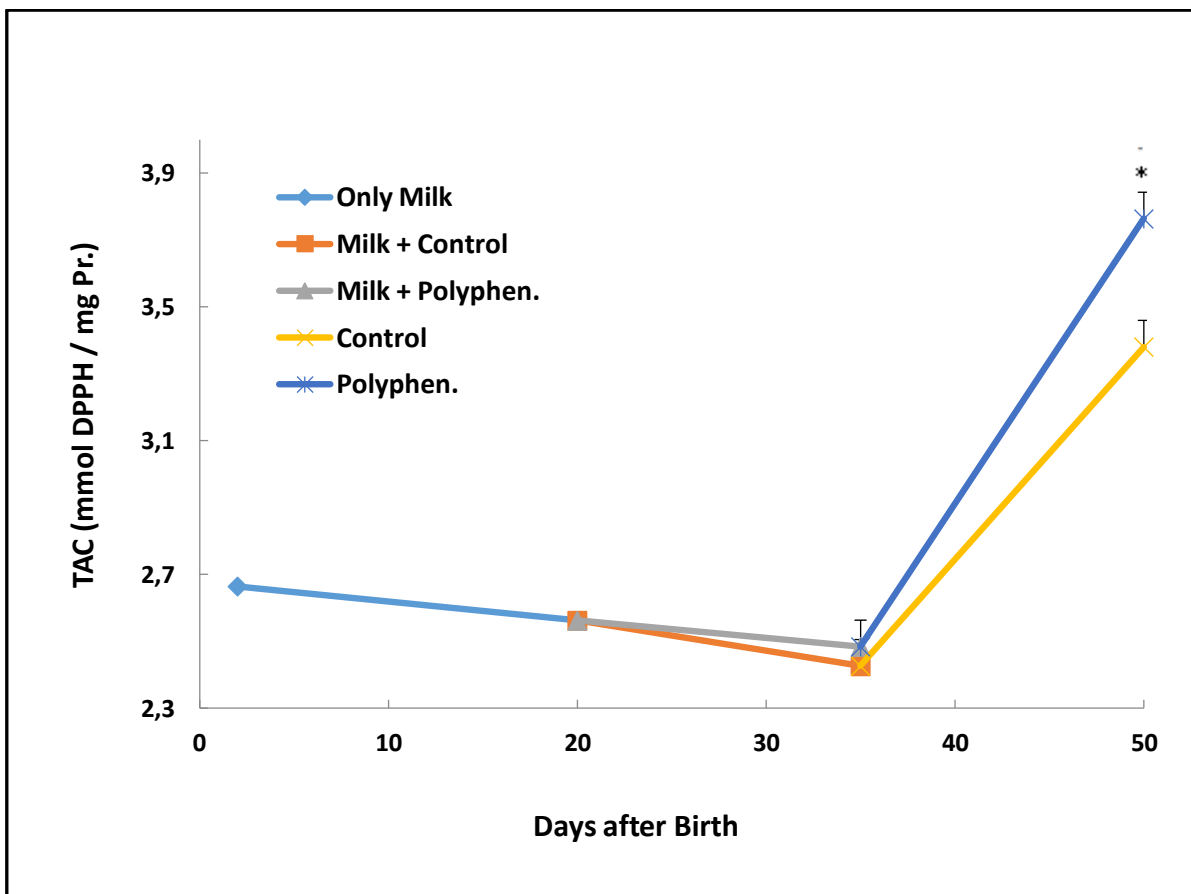


Διάγραμμα 10: Καταλάση στον Καρδιακό Ιστό

Καρδιακός	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαιν. Ομάδα	4,02	9,92

Πίνακας 13: Αύξηση Καταλάσης στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

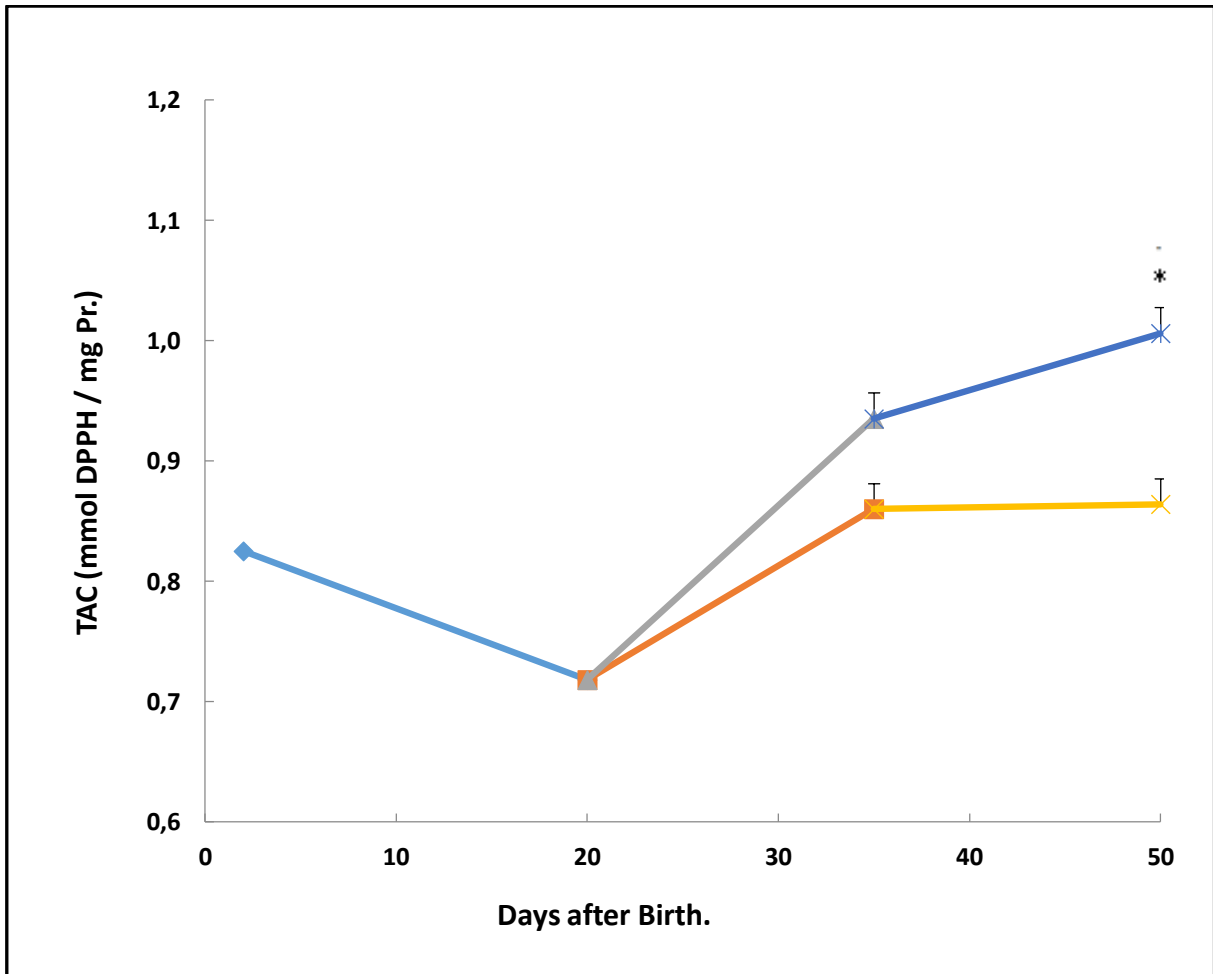
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον εγκεφαλικό ιστό με 19,55% ακολουθεί ο καρδιακός με 9,92% και τέλος, η σπλήνα με 8,98%.



Διάγραμμα 11: TAC στον Εγκεφαλικό Ιστό (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία)

Εγκέφαλος	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα	2,39	11,33

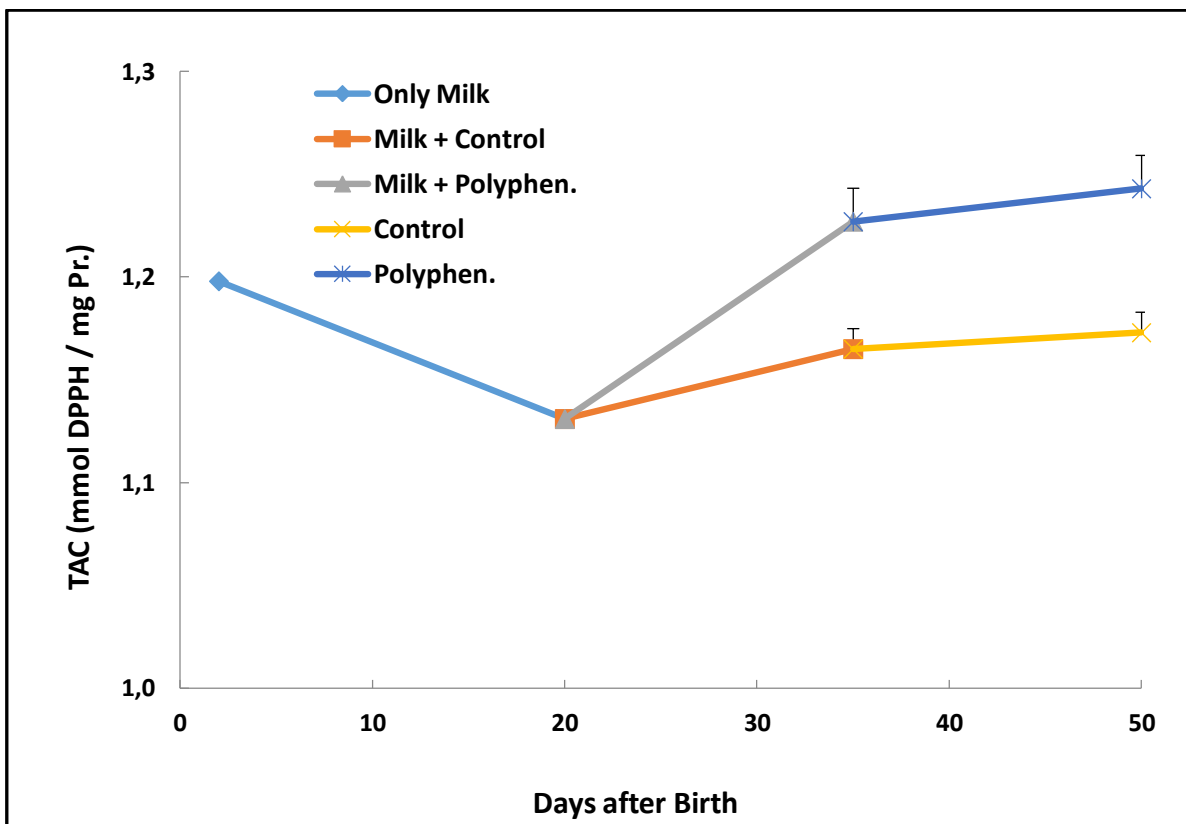
Πίνακας 14: Αύξηση TAC στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου



Διάγραμμα 12: TAC στον Ίστο Σπλήνας των Χοίρων

Σπλήνα	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα	8,72	16,44

Πίνακας 15: Αύξηση TAC στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

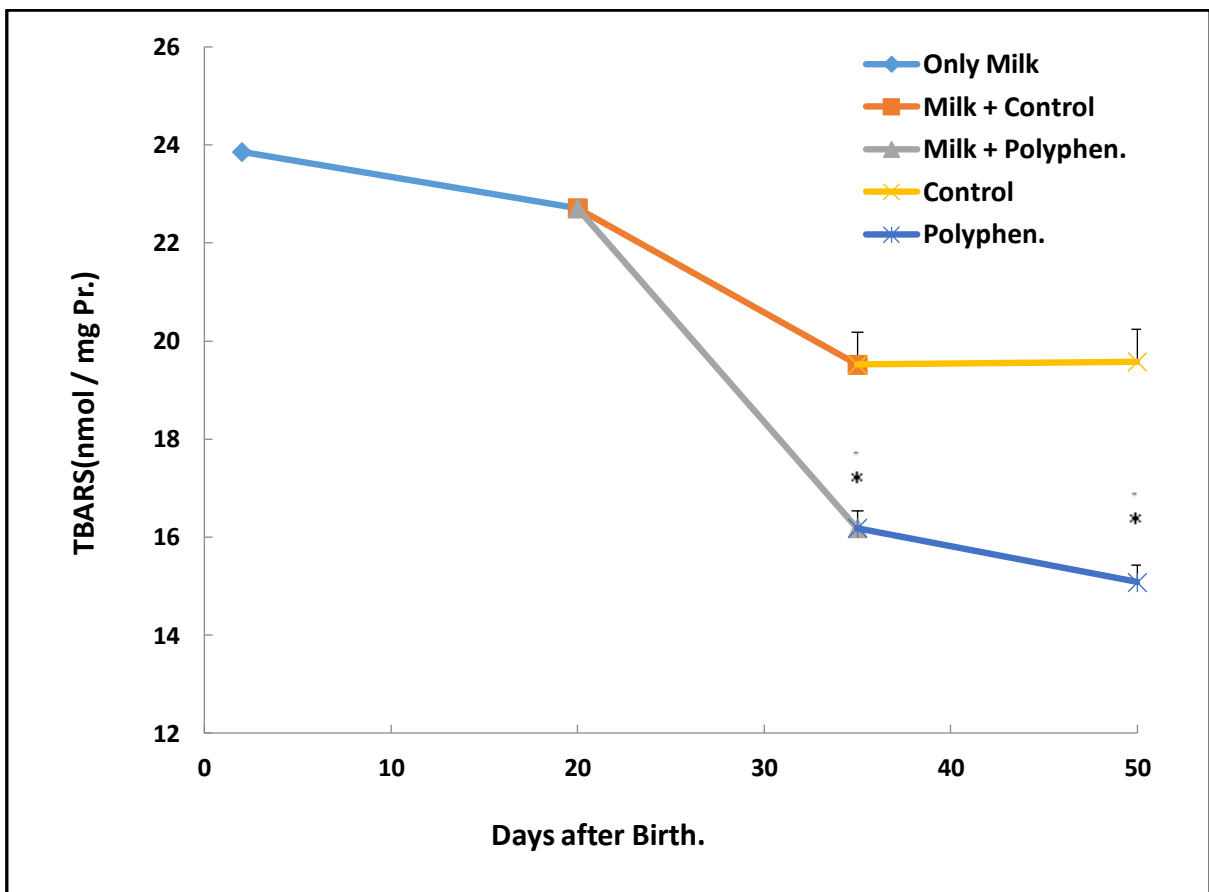


Διάγραμμα 13: TAC στον Καρδιακό Ιστό των Χοίρων

Καρδιά	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα	5,32	5,96

Πίνακας 16: Αύξηση TAC στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

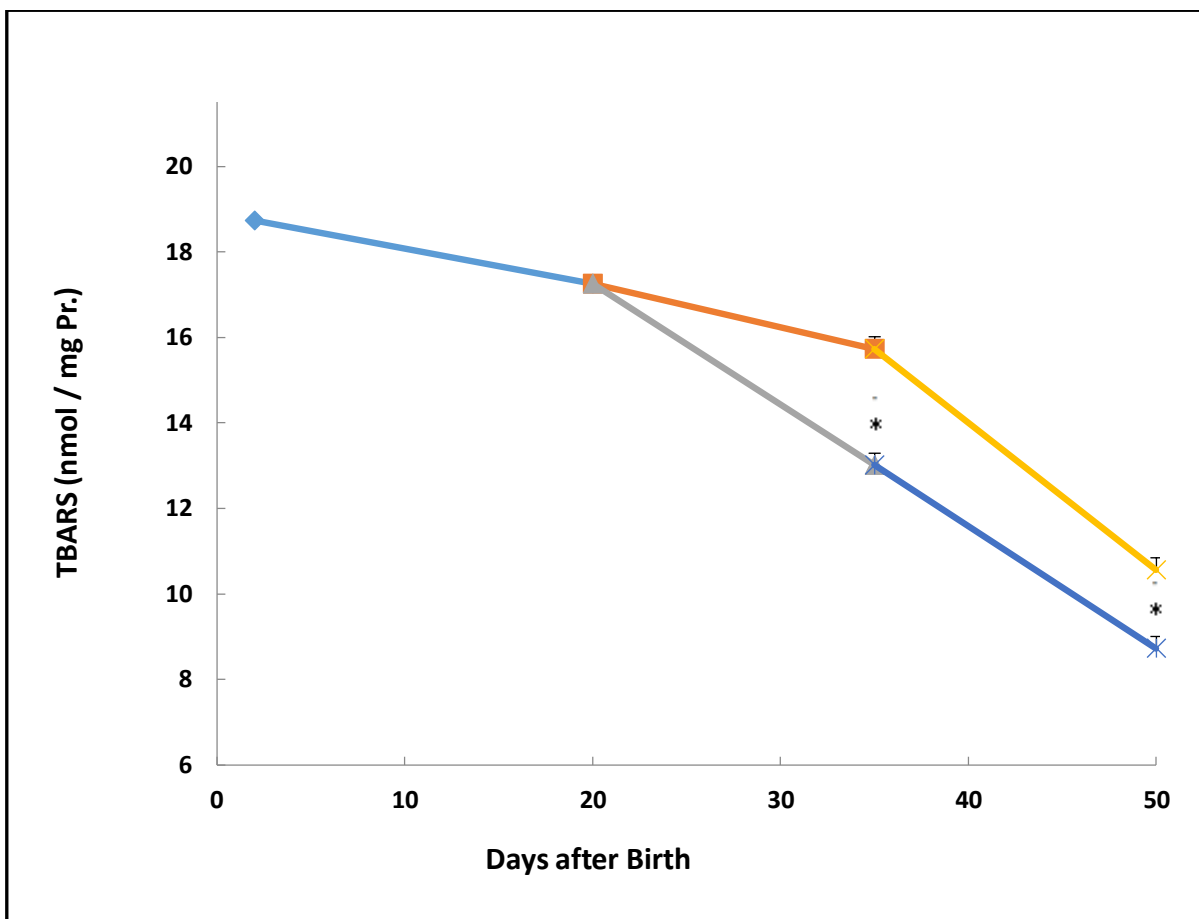
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της TAC, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον ιστό της σπλήνας με ποσοστό 16,44% ακολουθεί ο εγκεφαλικός με 11,33% και τέλος ο καρδιακός με 5,96%.



Διάγραμμα 14: TBARS στον Εγκεφαλικό Ίστο των Χοίρων

Εγκέφαλος	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν.Ομάδα	17,08	22,98

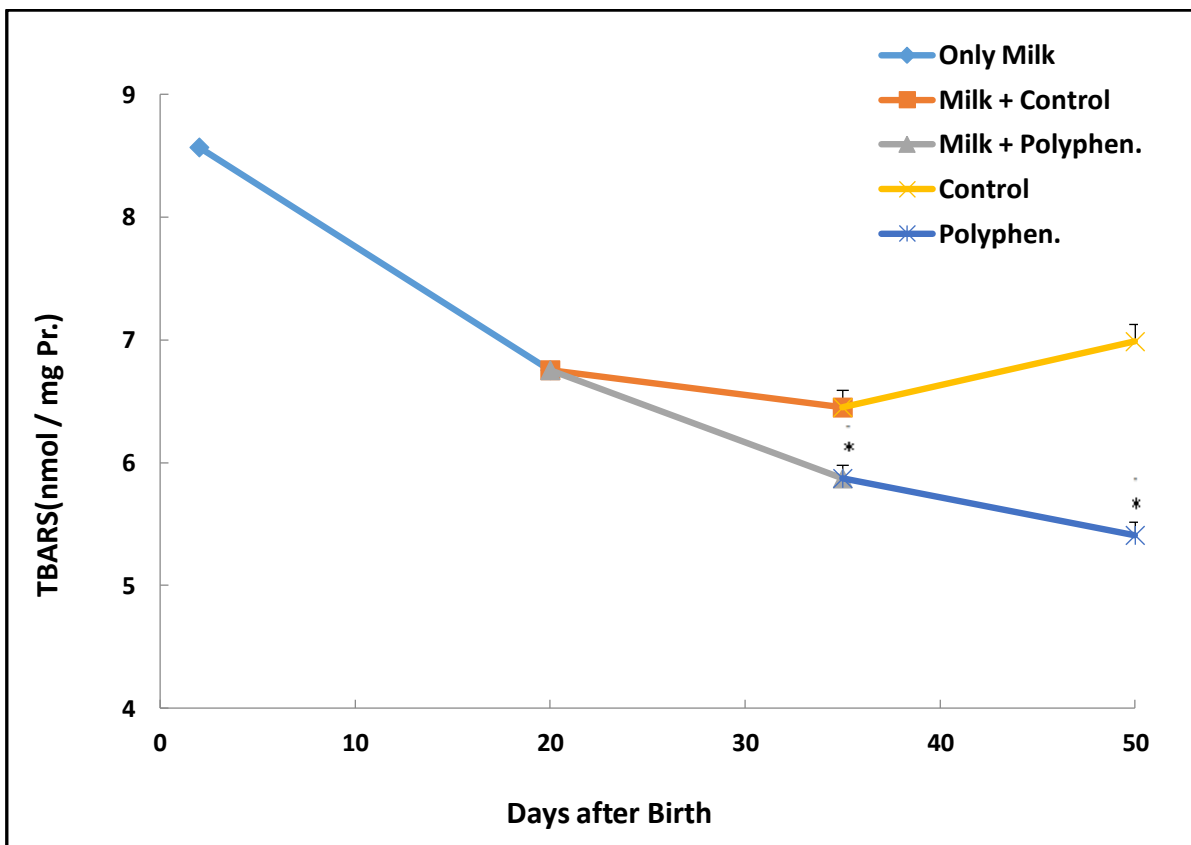
Πίνακας 17: Μείωση TBARS στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου



Διάγραμμα 15: TBARS στον Ίστο της Σπλήνας των Χοίρων

Σπλήνα	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα	17,27	17,37

Πίνακας 18: Μείωση TBARS στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

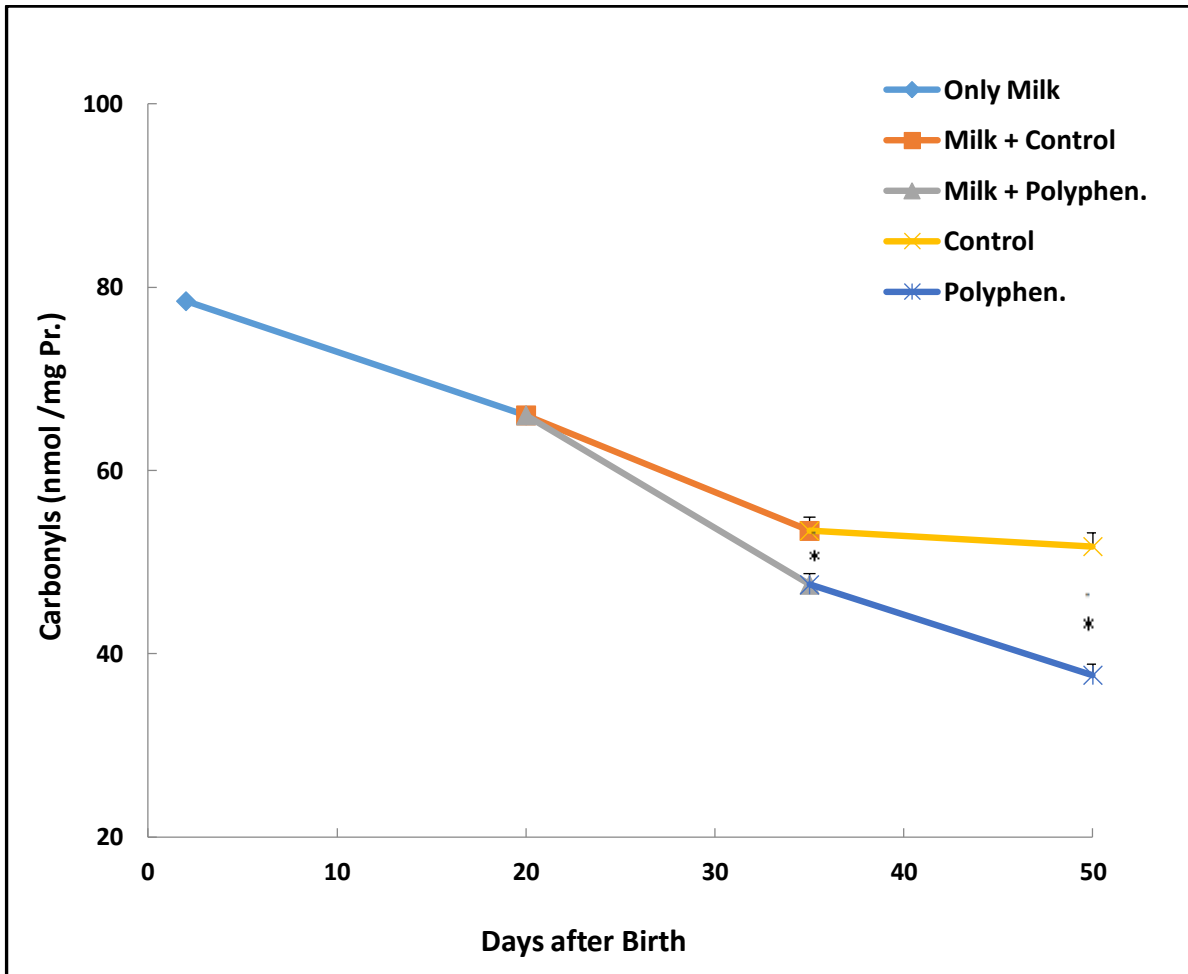


Διάγραμμα 16: TBARS στον Καρδιακό Ιστό των Χοίρων

Καρδιά	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα	8,96	22,58

Πίνακας 19: Μείωση TBARS στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

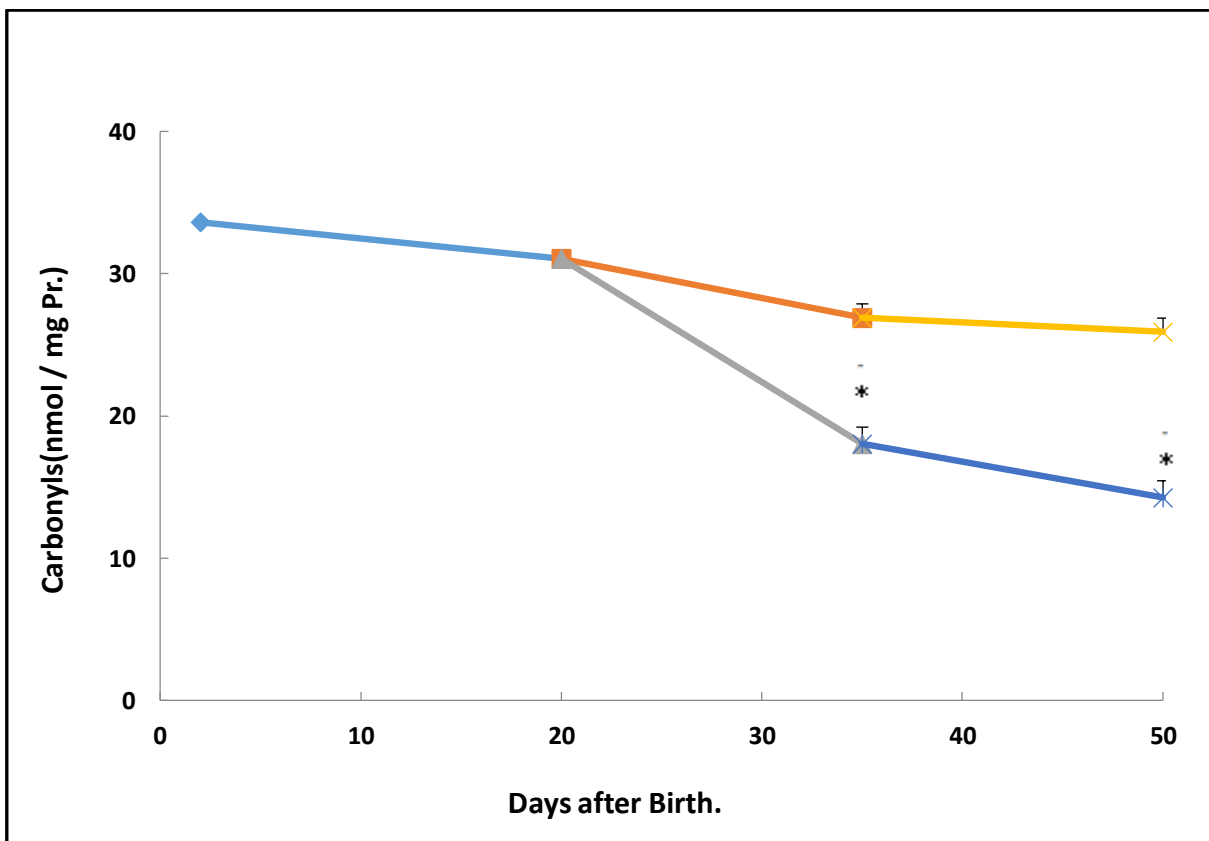
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει μείωση των TBARS στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη μείωση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον εγκεφαλικό ιστό με 22,98% ακολουθεί ο καρδιακός με 22,58% και τέλος η σπλήνα με 17,37%.



Διάγραμμα 17: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Εγκεφαλικό Ιστό

Εγκέφαλος	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα	11,01	27,15

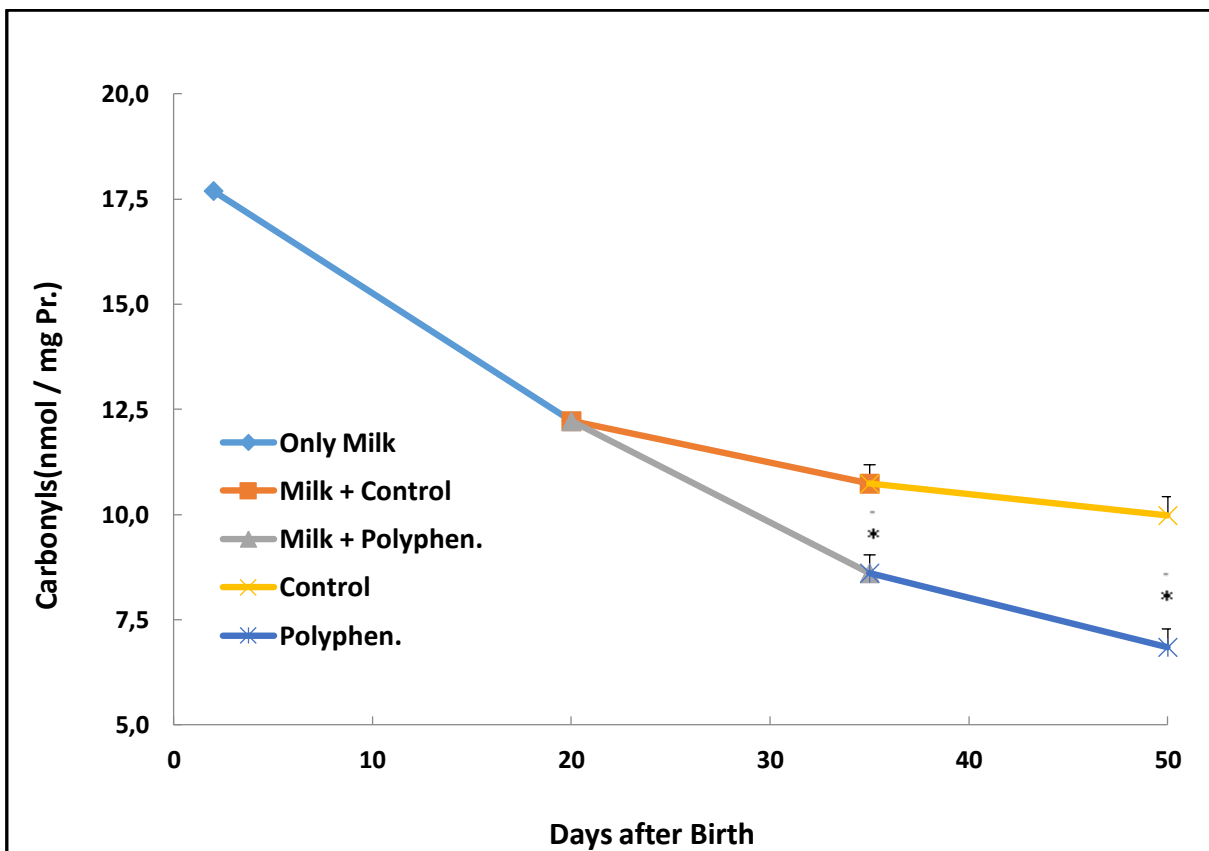
Πίνακας 20: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Εγκέφαλο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου



Διάγραμμα 18: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ιστό της Σπλήνας

Σπλήνα	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα	32,94	44,91

Πίνακας 21: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στην Σπλήνα της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

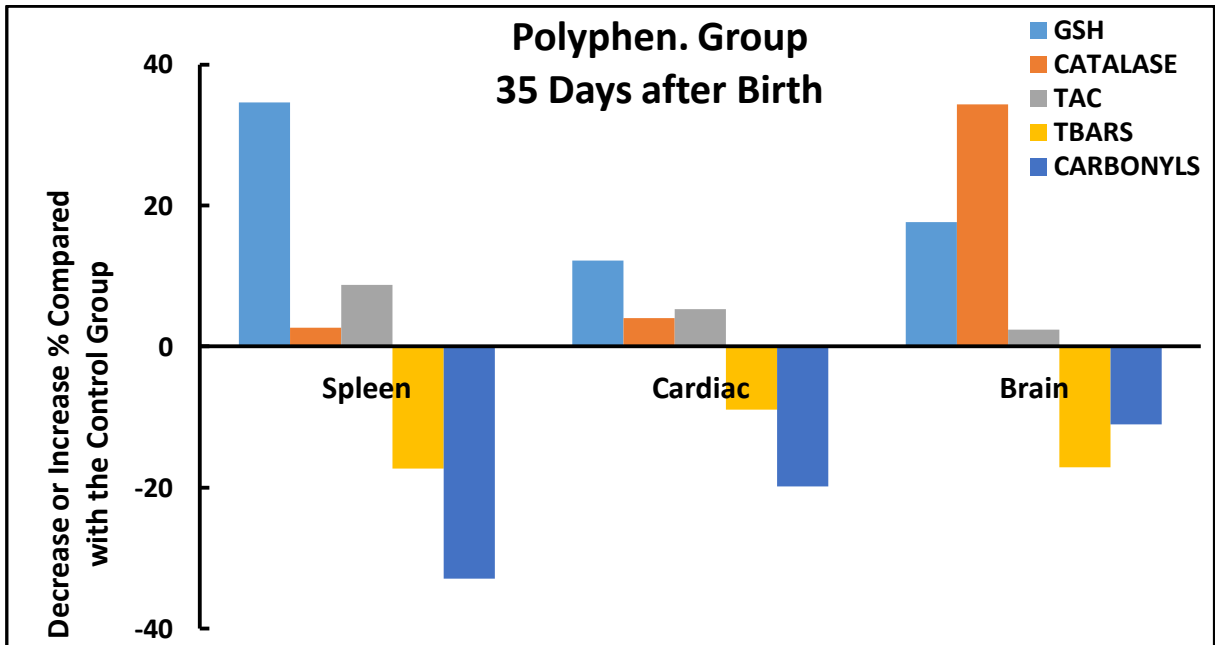


Διάγραμμα 19: Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Καρδιακό Ιστό

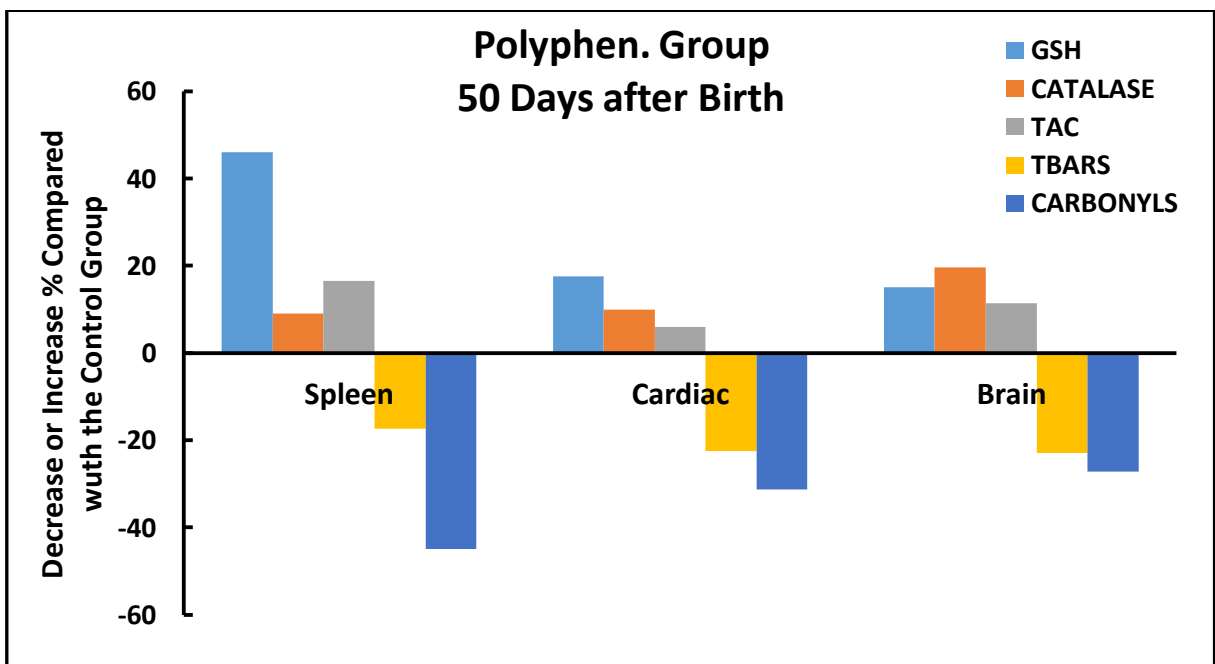
Καρδιά	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	19,83	31,36

Πίνακας 22: Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στην Καρδιά της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου

Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει μείωση των καρβονυλίων στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη μείωση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον ιστό της σπλήνας με 44,91% ακολουθεί ο καρδιακός ιστός με 31,36% και τέλος, ο εγκεφαλικός με 27,15%.



Διάγραμμα 20. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 35 Ημερών)



Διάγραμμα 21. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 50 Ημερών)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση των ζωοτροφών που περιέχουν υποπροϊόντα (κατακράτημα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων), με τη χρήση κεραμικών μεμβρανών μικροδιήθησης, για τον έλεγχο της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χοιριδίων κατά τη διάρκεια της περιόδου απογαλακτισμού. Το παραπροϊόν, προστέθηκε στο πρότυπο σιτηρέσιο των χοιριδίων για την κατασκευή μίας βιολειτουργικής τροφής με ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση. Συνολικά εικοσιέξι (26) χοιρίδια χρησιμοποιήθηκαν στα οποία έγιναν τέσσερις (4) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, συγκεκριμένα: στις δύο (2), είκοσι (20), τριάντα πέντε (35) και πενήντα (50) ημέρες από τη γέννησή τους. Πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι και την εικοστή (20) ημέρα από τη γέννηση, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε μετά την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα από τη γέννηση τους.

Τα αποτελέσματα, σχετικά με την οξειδοαναγωγική κατάσταση των χοιριδίων, εξετάστηκαν με την αξιολόγηση των βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες στους ιστούς (εγκέφαλο, καρδιά, και σπλήνα) και υποδεικνύουν ότι η ενσωμάτωση του παραπροϊόντος στην τροφή βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των νεαρών χοίρων. Η τροφή που περιέχει κατακράτημα αποβλήτων ελαιοτριβείων μείωσε τα ROS και την επαγόμενη οξειδωση των πρωτεϊνών, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων των CARB στους ελεγχόμενους ιστούς. Έτσι, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο σιτηρέσιο, θα μπορούσαν να αποτρέψουν την οξειδωση των πρωτεϊνών. Η μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($14,269 \pm 0.131$ nmol / mg Pr), εμφανίζεται στον ιστό της σπλήνας με 44,91%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, 30 ημέρες μετά τη χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου. Αυτή είναι η πρώτη εργασία που δείχνει ότι τα υποπροϊόντα από την επεξεργασία αποβλήτων ελαιοτριβείου μπορεί να προστατεύσουν τις πρωτεΐνες από την οξειδωτική βλάβη. Εκτός από την μείωση στην οξειδωση των πρωτεϊνών, παρουσιάστηκε επίσης μείωση στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων TBARS, ένας βιοδείκτης

της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων TBARS ($15,080 \pm 0.354$ nmol / mg Pr), εμφανίζεται στον εγκεφαλικό ιστό κατά 22,98%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, 30 ημέρες μετά τη χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές από τις σημαντικότερες πολυφαινόλες που βρέθηκαν στα υγρά απόβλητα ελαιολιβερού (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη κλπ) είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Cardinali et al., 2012; Rubio-Senent et al., 2014).

Η παρατηρούμενη μείωση στην οξειδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων στα χοιρίδια που κατανάλωσαν ζωοτροφές που περιείχαν τα υποπροϊόντα (κατακράτημα) από την επεξεργασία των αποβλήτων ελαιολιβερού, μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της TAC (δηλαδή, στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα). Είναι η πρώτη φορά που τα υποπροϊόντα από την επεξεργασία αποβλήτων ελαιολιβερού φαίνεται να αυξάνουν την TAC, σε χοιρίδια, σε μια in vivo μελέτη. Η μεγαλύτερη αύξηση της TAC ($1,006 \pm 0.022$ mmol DPPH / mg Pr), εμφανίζεται στον ιστό της σπλήνας κατά 16,44 %, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, 30 ημέρες μετά τη χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου. Επιπλέον, το κατακράτημα των επεξεργασμένων αποβλήτων ελαιολιβερού αύξησε την δραστικότητα της καταλάσης, ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, στους εξετασθέντες ιστούς των χοιριδίων. Η μεγαλύτερη αύξηση στη δραστικότητα καταλάσης ($503,54 \pm 8,51$ U / mg Pr), παρουσιάστηκε σε ιστό εγκεφάλου κατά 34,36%, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, 15 ημέρες μετά τη χορήγηση κατακρατήματος από επεξεργασμένα απόβλητα ελαιολιβερού. Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι το εκχύλισμα των αποβλήτων ελαιολιβερού αυξάνει τη δραστικότητα καταλάσης στο πλάσμα, το ήπαρ και τους νεφρούς αρουραίων (Hamden et al., 2009).

Επιπλέον, τα επίπεδα της GSH ήταν σημαντικά αυξημένα στους ιστούς των χοιριδίων, στην ομάδα που έλαβε το κατακράτημα των υγρών αποβλήτων ελαιολιβερού. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση της GSH αυξήθηκαν περαιτέρω μετά την κατανάλωση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου. Η μεγαλύτερη αύξηση στην GSH ($0,276 \pm 0,013$ μmol / mg Pr), εμφανίστηκε στον ιστό της σπλήνας με 46,03 % σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, 30 ημέρες μετά τη χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου. Σήμερα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις

φυτοχημικές ενώσεις, που επηρεάζουν την σύνθεση της GSH και σχετίζονται με την έρευνα της φυσιολογίας και της βιοχημείας της γλουταθειόνης, με έμφαση στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Lushchak, 2012). Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε ανθρώπους έχει επίσης δείξει ότι η κατανάλωση του εκχυλίσματος αποβλήτων ελαιολιβερού, αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα (Visioli et al., 2009). Μια εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να είναι ότι σε 15 και 30 ημέρες μετά την έναρξη της σίτισης, τα νεαρά χοιρίδια είχαν χαμηλά επίπεδα GSH και με την χορήγηση του πολυφαινολικού σιτηρεσίου, αυξήθηκαν τα επίπεδά της. Αυτό το αποτέλεσμα που μας δίνει το συγκεκριμένο σιτηρέσιο στην GSH, πιθανώς να προέρχεται μέσω της διαφοροποίησης των κύριων ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεσή της, όπως γ-glutamylcysteine λιγάσης (GCL) και GSH συνθεάσης (Aquilano et al., 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών προκαλείται μέσω του στοιχείου αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element - ARE), μία ενεργή ενισχυτική αλληλουχία, που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar et al., 2014). Έτσι, οι ενώσεις του κατακρατήματος των αποβλήτων ελαιολιβερού μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα GSH επάγοντας την έκφραση ή την ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων σε χοιρίδια με χαμηλή GSH. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρατηρούμενη αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των χοιριδίων από ζωοτροφές που περιέχουν προϊόντα αποβλήτων ελαιολιβερού, οφείλεται κυρίως στο πολυφαινολικό περιεχόμενό τους.

Τα παραπάνω αποτελέσματα από όλους τους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες που ελέγχθησαν, δείχνουν ότι η προσθήκη του υποπροϊόντος (κατακράτημα των υγρών αποβλήτων ελαιολιβερού) από την επεξεργασία τους με τη χρήση κεραμικών μεμβρανών μικροδιήθησης, στην τροφή των χοιριδίων βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση τους. Αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι οι διαφορετικές παθολογικές συνθήκες των αγροκτηνοτροφικών ζώων πιστεύεται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ζώων (Lykkesfeldt και Svendsen 2007). Το θερμό και υγρό περιβάλλον στα χοιροστάσια, μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες σε χοιρίδια, το οποίο με τη σειρά του μειώνει την ανάπτυξη και την ποιότητα του κρέατος. Έτσι, η χορήγηση των φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε χοιρίδια έχει

προταθεί ως μέσο για τη μείωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από ανεπιθύμητες ενέργειες (Hou, et al., 2014). Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δείχνουν για πρώτη φορά ότι οι ζωοτροφές που περιέχουν πολυφαινόλες και που προέρχονται από τα υποπροϊόντα επεξεργασίας αποβλήτων ελαιολιτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των χοιριδίων με την μείωση της οξειδωτικής βλάβης των βιολογικών μορίων (δηλαδή την οξείδωση των πρωτεϊνών, την υπεροξείδωση των λιπιδίων) και την αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (π.χ. δραστηριότητα της καταλάσης, γλουταθειόνης και τα επίπεδα της TAC). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, το πολυφαινολικό σιτηρέσιο θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άλλα εκτρεφόμενα ζώα ή ακόμα και σε ανθρώπινες τροφές. Η χρήση αυτή θα μπορούσε επίσης να είναι μια καλή λύση για τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα απόβλητα των ελαιολιτριβείων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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
2. 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
3. Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol.* 26; 5:196.
4. 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.
5. 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.
6. Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G. "Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters." 1995. *J. Appl. Bacteriol Oct*; 79(4): 393-398.
7. Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., Lattanzio, V., 2012. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill Waste water as possible food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 60(7):1822-1829.
8. Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial.

Clinical Nutrition, 30 (4), pp. 490-493.

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

10. 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.

11. 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

12. Cicerale, S., Lucas L., Russell, K. (2010) Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 458-479.

13. De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martin-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. 2000. "Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol". *Thromb. Res.* 100(4):305-315.

14. De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. 1999. "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil" *Biochem. Pharmacol* 57(4):445-9.

15. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, de la Torre C, Marrugat J. 2000. "Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds". *Med Clin (Barc)* Jul 1; 115(5): 166-9.

16. Giaginis C. and Theocharis s. (2011) Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum *Nutrition and Cancer*, 63(8): 1174–1184.

17. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. Role of free radicals and catalytic

metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* 186, pp. 1-85.

18. 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.

19. Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., Elfeki, A., 2009. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.* 180(3):421-432.

20. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721–724

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

22. Hou, X., Zhang, J., Ahmad, H., Zhang, H., Xu, Z., Wang, T., 2014. Evaluation of Antioxidant Activities of Ampelopsin and Its Protective Effect in Lipopolysaccharide- Induced Oxidative Stress Piglets. *Public Library of Science (PLOS)*, Vol. 9, Issue 9, e108314.

23. Ibiebele 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.

24. Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spiegelhalter B., Bartsch H., Owen R. W. (2003) Consumption of Argan Oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects *European Journal of Cancer Prevention* 12:67-75

- 25.** 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
- 26.** 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.
- 27.** Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K. “Inhibition of arachidonate lipooxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives”. 1997. *Biosci Biotechnol Biochem.* Feb; 61(2):347-350.
- 28.** Kumar, H., Kim, I.S., More, S.V., Kim, B.W., Choi, D.K., 2014. Natural product- derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.* 31(1):109-139.
- 29.** 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.
- 30.** 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.
- 31.** Long H., Yang H., Lin Y., Situ D. and Liu W. (2013) Fish Oil-Supplemented Parenteral Nutrition in Patients Following Esophageal Cancer Surgery: Effect on Inflammation and Immune Function *Nutrition and Cancer*,

65(1): 71–75.

32. Lushchak, I. V., 2012. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. Review Article. *Journal of Amino Acids*.

33. Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in Disease oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173(3):502-11.

34. Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Zappia, V. “Olive Oil Phenolic Compounds Inhibit Homocysteine – Induced Endothelial Cell Adhesion Regardless of Their Different Antioxidant Activity”. 2009. *Agric. Food Chem.*, 57, 3478-3842.

35. Medina E, Brenes M, García A, Romero C, de Castro A. “Bactericidal activity of glutaraldehyde-like compounds from olive products” 2009 *Food Prot. Dec*; 72(12):2611-2614.

36. 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.

37. Oude Elferink S.J.W.H., Driehuis F., Gottschal J.C., and Spoelstra S.F (FAO Electronic Conference on Tropical Silage; Silage fermentation processes and their manipulation).

38. 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.

39. Paiva-Martins F., Fernandez, J., Rocha, S., Nascimento, E., Vitorino, R. “Effects of olive soil polyphenols on erythrocyte oxidative damage”. 2009. *Mol. Nut. Food Res.*, 53. 609-616.

40. Pal et al., 2010; Kiani et al., 2005; Ibiebele et al., 2013; Shim et al., 2012; Niclis et al., 2011; Lin & Cai, 2012; Cicerale et al., 2008; Vainio et al., 1999;

Wells et al., 2008

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

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

43. Rubio-Senent, F., de Roos, B., Duthie, G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., 2014. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur. J. Nutr.* [E. pub. ahead of print].

44. Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M.A. 2012. “Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer”. *Archives of Biochemistry and Biophysic.*

45. Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. (2004) Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview *Asian Pacific J Cancer Prev*, 5: 237-245.

46. Syed Harris Omar. “Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive”. 2010. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 111-121.

47. Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. (2011). Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo.* 25(4):657-62.

48. Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J. 2007. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *Agric. Food Chem.* 55(13):5246-5252.
49. Stagos D, Spanou C, Veskoukis AS, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. (2012). Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo.* 25(4):657-62.
50. Vainio H. (1999) Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story *British Medical Bulletin* 55 (3): 593-599.
51. 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.
52. Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M.I., Crea, R., (2009). Olive Phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J. Agric. Food Chem.* 57(5):1793-1796.
53. Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res.* 83(1):35-44.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<http://www.neadiatrofis.gr/2013/06/oi-polifenoles-pigi-ygeias-sti-diatrofi-mas.html>

<http://digilib.lib.unipi.gr/dspace/bitstream/unipi/1611/1/Ntolia.pdf>

http://kardiologika.blogspot.gr/2013/03/blog-post_28.html