«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ »

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας »

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN TISSUES (BRAIN & QUADRICEPS) FROM SHEEPS CONSUMED FEED WITH OLIVE MILL WASTEWATERS

ΑΡΓΥΡΟΥΛΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

«**Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ιστούς (εγκέφαλο και τετρακέφαλο) από νεαρά πρόβατα κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.** »

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ....3

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ....6

ΠΕΡΙΛΗΨΗ....7

ABSTRACT....9

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ....11

1.1. Ιστορική Αναδρομή 11
1.2. Ελεύθερες Ρίζες 12
1.3. Δημιουργία Ελεύθερων Ριζών 13
1.3.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΜΟ) 15
1.3.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS) 18
1.4. Οξειδωτικό Στρες 18
1.5. Αντιοξειδωτική Ουσία 19
1.5.1. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών 20
1.5.2. Ενδογενή Αντιοξειδωτικά 20
1.5.3. Εξωγενή Αντιοξειδωτικά 21
1.6. Διαταραχές υγείας – Οξειδωτικό Στρες 22
1.6.1 Διαταραχές στην υγεία των ζώων – Οξειδωτικό Στρες 23
1.7. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις 24
1.7.1 Πολυφαινόλες 24
1.7.2. Φυσικές Ιδιότητες 25
1.7.3. Χημική Δομή-Ιδιότητες 25
1.7.4 Ταξινόμηση Πολυφαινολών 26
1.8. Το «Γαλλικό» Παράδοξο 28
1.9. Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικές Δράσεις 28
1.9.1 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία 29
1.10. Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου(Υ.Α.Ε.) 31
1.10.1 Ελαιοευρωπαϊνη 31
1.11. Επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και των Υ.Α.Ε. 33
1.12. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου στο περιβάλλον 35
1.13. Γενικές Πληροφορίες για τα Πρόβατα 36
1.13.1 Χαρακτηριστικά 36
1.13.2 Εγκυμοσύνη 36
1.13.3 Το «Χίωτικο» πρόβατο 37
1.14. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών 37
1.15. Γενικές πληροφορίες για τον εγκεφαλικό ιστό 38
1.16. Γενικές πληροφορίες για τον τετρακέφαλο μυ 39

2. ΣΚΟΠΟΣ....40

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ....41

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3.1. Γενικά 41
3.2. Πειραματικό πλάνο 41
3.3. Βιολειτουργικές Ζωοτροφές 42
3.3.1 Προετοιμασία Ενσιρώματος YAE 43
3.3.2 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών Προβάτων 44
3.3.3 Παραγωγική Διαδικασία Ενσιρώματος 46
3.4 Φάσεις Ενσίρωσης 47
3.5 Αντιοξειδωτική δράση των ζωοτροφών (in vitro) 49
3.6 Ιστολήψια 49
3.6.1 Ομογενοποίηση Ιστών 50
3.7 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες 51
3.7.1 Γενικά 51
3.7.2 Μέθοδοι 51
3.7.2.1 Μέτρηση γλουταθειόνης 51
3.7.2.2 Δραστικότητα καταλάσης 56
3.7.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα 59
3.7.2.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) 62
3.7.2.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια 64
3.7.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford 67
3.8. Στατιστική ανάλυση 67

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 68

4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τα πρόβατα 68

4.1.1. Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών των προβάτων. 69
4.2. Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στον ιστό του εγκεφάλου και του τετρακέφαλου μυ 69
4.2.1 Αποτελέσματα Γλουταθειόνης (GSH) 70
4.2.2 Αποτελέσματα Καταλάσης (CAT) 72
4.2.3 Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) 75
4.2.4 Αποτελέσματα TBARS 77
4.2.5 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων 80

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 82

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 87

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα κ.Μακρή Σωτηρία, η οποία βοήθησε τα μέγιστα τόσο στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας με την καθολική της παρουσία, όσο και στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω συνολικά όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν στο εργαστήριο βοηθώντας με στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και στην απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της πτυχιακής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Τα είκοσι οχτώ (28) πρόβατα τα οποία εκτράφηκαν, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες. Σε κάθε μία από αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ η δεύτερη την πολυφαινολική ομάδα, το σιτηρέσιο της οποίας ήταν εμπλουτισμένο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε), που περιέχουν πολυφαινόλες.

Τα πρόβατα εκτράφηκαν με το πειραματικό σιτηρέσιο για πενήντα (50) ημέρες, διότι τις πρώτες 15 ημέρες, τρέφονταν μόνο με το μητρικό γάλα. Πραγματοποιήθηκαν 3 ιστοληψίες. Η πρώτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε δέκα πέντε (15) ημέρες μετά την γέννηση των προβάτων, από τέσσερα (4) ζώα, με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους άμυνας σε πρόωρη ηλικία. Τα υπόλοιπα πρόβατα χωρίστηκαν σε δύο ισοδύναμες (2) ομάδες, των δώδεκα (12) ατόμων. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η πρώτη ομάδα είναι η ομάδα ελέγχου που λαμβάνει το κανονικό σιτηρέσιο και η δεύτερη ομάδα λαμβάνει το πολυφαινολικό σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Η δεύτερη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε σε δώδεκα (12) πρόβατα, έξι (6) από την κάθε ομάδα, ηλικίας σαράντα δύο (42) ημερών ενώ η τελευταία ιστοληψία έγινε σε δώδεκα (12) πρόβατα ηλικίας εβδομήντα (70) ημερών, έξι (6) από κάθε ομάδα.

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν:

- Για τη γλουταθειόνη (GSH), αυξημένα επίπεδα στον εγκέφαλο στις 42 (36,9%) και 70 (12,8%) ημέρες και στο μυ στις 70 ημέρες (40,8%) στην ομάδα YAE σε σχέση με την ομάδα Control.
- Για τη καταλάσης (CAT), αυξημένα επίπεδα το μυϊκό ιστό των 70 ημερών (116,7%) στην πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), αυξημένα επίπεδα στον εγκεφαλικό ιστό και στις δύο ιστοληψίες των 40 (56,1%) και 70 (32,6%) ημερών.
- Για την υπεροξείδωση λιπιδίων (TBARS), μειωμένα επίπεδα στο μυ στις 42 ημέρες (-11,9%) και στον εγκέφαλο στις 70 ημέρες (-52,0%) σε σύγκριση της ομάδας YAE με την ομάδα ελέγχου.
- Για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, μειωμένα επίπεδα στο μυϊκό ιστό των 70 ημερών (-20,5%) στην πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα Control.

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ABSTRACT

In the present study, a farming took place at the stage of ablactation of twenty eight (28) young sheep, the Greek "Chios" race, with feed containing polyphenolic additives from treated Olive Mill Wastewaters (OMWW) in order to effect Control of its antioxidant action in the brain and muscle tissue.

The twenty eight (28) sheep which were bred, were divided into two (2) groups. In each of these two groups different diets were given. The first group was the Control group and the second group of polyphenolic, the feed of which was enriched with polyphenolic additives from Olive Mill Wastewaters. The sheep were fed with the experimental diet for fifty (50) days. Tissues were collected from the experimental animals at 3 different time-points. The first time-point was fifteen (15) days after the birth of sheep in order to check their antioxidant status at early age. The second time-point was at forty two (42) days after birth, and the last time-point was at seventy (70) days after birth.

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

Specifically observed:

- For the glutathione (GSH), observed elevated levels in brain in all 42 (110%) and 70 (149.96%) days and in muscle in 70 days (40,8%) in group OMW than those of the Control group.
- The catalase (CAT), observed elevated levels in muscle tissue 70 days (116.7%) in polyphenolic group relative to the Control group.
- For the total antioxidant capacity (TAC), elevated levels in the brain tissue in both time-point 40 (56.1%) and 70 (32.6%) days.
- For the lipid peroxidation (TBARS), reduced levels of muscle in 42 days (-11.9%) and in the brain at 70 days (-52.0%) compared to the group YAE with the Control group.
- For the lipid peroxidation (TBARS), observed reduced levels at 70 days (-20,5%) in the polyphenol group relative to the Control group.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

In conclusion, the polyphenolic additives of OMW had a beneficial effect on muscle tissue and in the brain tissue. Therefore, further research is needed to clarify the influence of OMW, and their mechanism of action in specific tissues. However, these results were positive in conjunction with the fact that use of OMW in production of food simultaneously resolve and ecological problems are created when thoughtlessly deposited in the environment.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Το οξυγόνο (O2) είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής καθώς χρησιμοποιείται στη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια, διασπώντας και οξειδώνοντας τις τροφές. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα επιβλαβή για τους οργανισμούς και να προκαλέσει ανεπιθύμητες επιδράσεις για την υγεία. Η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη χορήγησή του, το καθιστά τοξικό κάτι που χαρακτηρίζεται ως «βιοχημικό παράδοξο». Το 1775 ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έβαλε τα θεμέλια για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: αυτό που ονομάζουμε «παράδοξο του οξυγόνου».

Τα αίτια που καθιστούσαν το οξυγόνο τοξικό με δηλητηριώδες ιδιότητες ήταν άγνωστα. Το 1954 ο Gershman ήταν ο πρώτος που έδωσε απάντηση και σύμφωνα με τη θεωρία του η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα της «ελεύθερης ρίζας» υποστηρίζοντας ότι αυτά τα συστατικά έχουνε καταλυτικό ρόλο στη βιολογική γήρανση μέσω της πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1969 η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποτέλεσε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελεύθερων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Καθώς οι έρευνες σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών συνεχίζονταν, το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές σχετικά με τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές και άλλοτε βλαπτικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς (Valko et al., 2007).

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έρχονται όλο και πιο κοντά στην επίλυση των επιβλαβών δράσεων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας διευρύνεται συνεχώς καθώς αρκετές μελέτες δείχνουν πλέον συσχέτιση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με την παθογένεση πολλών ασθενειών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.2. Ελεύθερες Ρίζες

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

Ένα άτομα ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell and Gutteridge, 1990) (Gilbert, 2000). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα . Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται το ίδιο σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ. (Εικ.1). Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell and Gutteridge, 1990). Η αλυσιδωτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν.

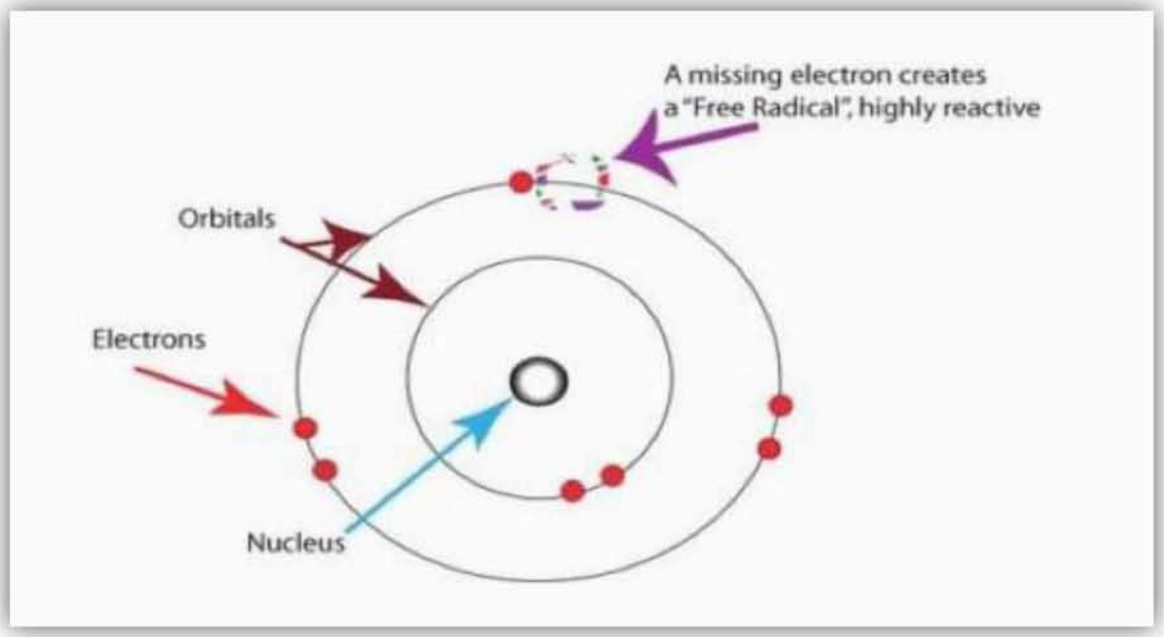
Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Η δραστικότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση του περιβάλλοντος μέσου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

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

(Giles and Jacob, 2002).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την απουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου που οδηγεί στο σχηματισμό μίας ελεύθερης ρίζας.

1.3. Δημιουργία Ελεύθερων Ριζών

Όπως είναι γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Αρχικά, το οξυγόνο που εισέρχεται στον οργανισμό με την αναπνοή και στη συνέχεια μεταφέρεται διαμέσου του αίματος στα κύτταρα. Το μεγαλύτερο ποσοστό (95%) του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας και αποθηκεύεται υπό τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της οξειδωτικής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξείδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια παράγονται διάφορα προϊόντα, ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο. Το υπόλοιπο μέρος του εισερχόμενου οξυγόνου (5%) χρησιμοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko et al. 2006):

Οι βασικότερες πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής: η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση.

Ενζυμικά συστήματα όπως είναι το κυτόχρωμα P450, η NADH οξειδάση, η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν τις κυριότερες ενζυμικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

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

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

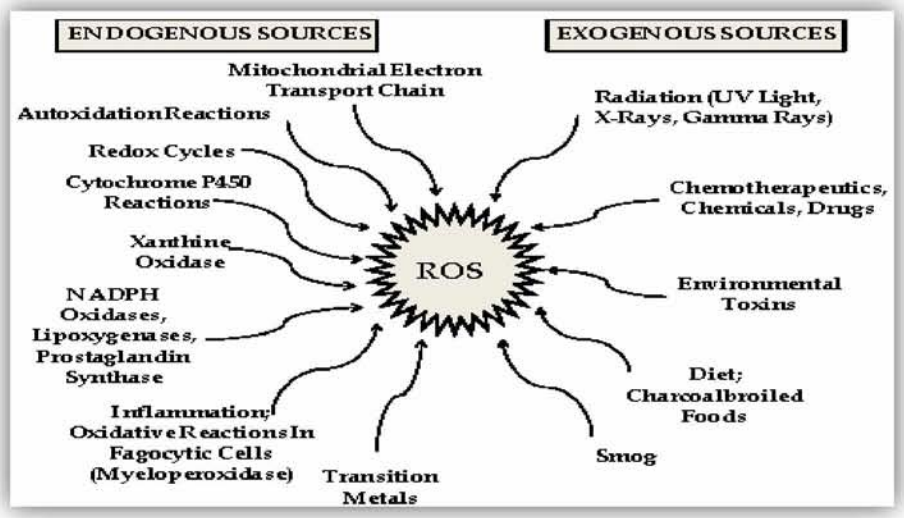
Η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστούς). Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα (COOKE et al., 2003; Fujisawa et al., 2004; Pani et al., 2010; Vainio, 1999). Τέτοια κύτταρα είναι τα φαγοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων ριζών.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια. Το αποτέλεσμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

είναι η μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου η οποία προκαλεί απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης, 2014).

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανθρώπινη ζωή, ενώ επηρεάζεται και από αρκετούς εξωγενείς παράγοντες. Αυτοί μπορεί να είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων, η ατμοσφαιρική ρύπανση καθώς και τα συστατικά που περιέχονται στα τσιγάρα (Εικ.2). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές



Εικόνα 2: Τρόποι σχηματισμού ελεύθερων ριζών.

1.3.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΜΟ)

Οι ROS χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής. Όλες οι ROS έχουν την ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο (οξείδωση) και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου.
Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- η ρίζα σουπεροξειδίου (O2•-),
- η ρίζα υδροξυλίου (OH •),
- η ρίζα υπεροξειδίου (ROO•),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- το O2 μονής κατάστασης ή μονήρες οξυγόνο,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2)
- και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

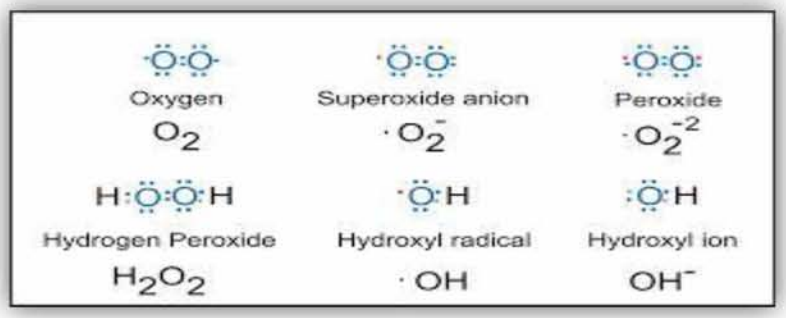
Το σουπεροξείδιο ($O_2^{\bullet-}$) και η ρίζα υδροξυλίου (OH•) είναι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες όπως έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1991; Halliwell and Gutteridge, 1990)(Von Sonntag, 1987). Το ($O_2^{\bullet-}$) έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου και παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα αμινοξέα και τα μέταλλα. Οι σημαντικότερες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell & Gutteridge, 1999). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού, καθώς από τη μία αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων ενδιαμέσων μορίων με οξειδοαναγωγικό δυναμικό και από την άλλη συμμετέχει στις διαβιβαστικές οδούς ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (Παπαγαλάνης, 2014). Οι ρίζες υπεροξειδίου (ROO•), είναι τοξικές για τα κύτταρα καθώς μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και έτσι με αυτό τον τρόπο προωθούν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Παπαγεωργίου, 2005). Το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H_2O_2 και το $O_2^{\bullet-}$. Είναι πολύ δραστικό χημικά και οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έχει την ικανότητα να καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C, με αποτέλεσμα να επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων στο υποχλωριώδες οξύ προκαλεί οξειδωτικές βλάβες (Whiteman et al., 2005). Το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή αυτή του O_2 η οποία λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (tripletstate) και συμβολίζεται με $3O_2$ δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (singletstate) και συμβολίζεται με $*O_2$. Το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, όμως τα ηλεκτρόνιά του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση είναι πολύ δραστικά και μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις (Εικ.3). Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Δηλαδή, είτε μέσω απορρόφησης της επαρκούς ενέργειας για την αναστροφή του spin σε ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είτε μέσω μονοσθενής αναγωγής. Έτσι, θα προκύψει ο σχηματισμός οξυγόνου μονής κατάστασης, του οποίου τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλα spin, και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων.

Συνοψίζοντας, διαπιστώνουμε ότι, οι ελεύθερες ρίζες κυρίως οι πολύ δραστικές όπως είναι η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστικότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova, 2010).

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

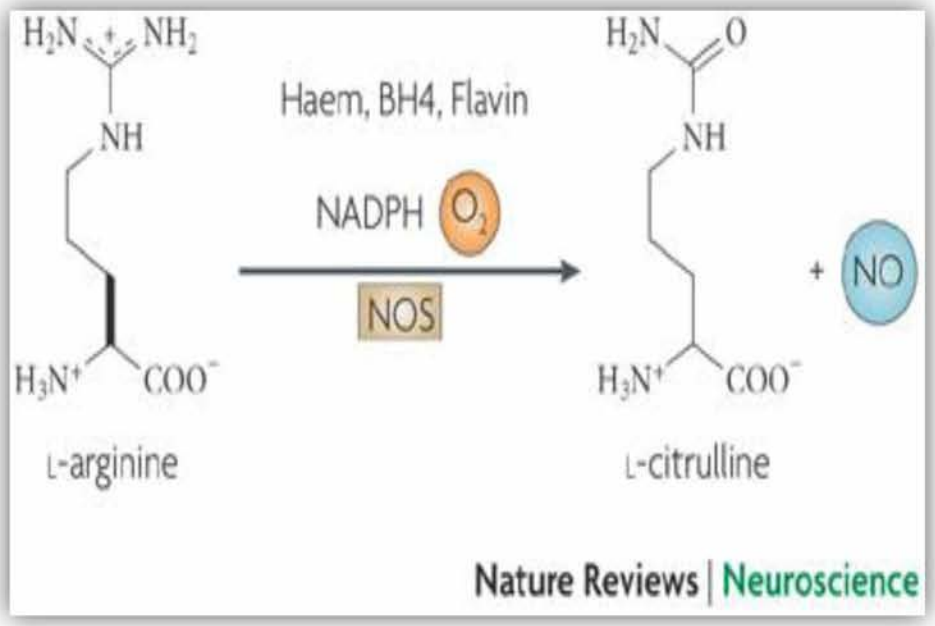


Εικόνα 3: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.3.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Τα δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που προέρχονται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο παράγεται μέσω της ενζυμικής δραστικότητας της συνθάσης του NO (NOS_2) (Iovine et al., 2008). Έτσι, η κύρια πηγή δραστικών ειδών αζώτου είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) (Εικ.4). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O_2), με το υπεροξείδιο ($O^{2\ -}$), με την αιμοσφαιρίνη και γενικά με πρωτεΐνες που περιέχουν συναθροίσεις (clusters) ομάδων με δεσμούς δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με θείο (iron-sulfur centers) καθώς και με άλλες ρίζες πρωτεϊνών και λιπών. Τα παραγόμενα προϊόντα και η τροποποίηση διαφόρων βιομορίων από αυτά, έχουν ουσιαστική συμμετοχή στο μεταβολισμό και στο επίπεδο του οξειδωτικού στρες του οργανισμού (Παπαγαλάνης, 2014).



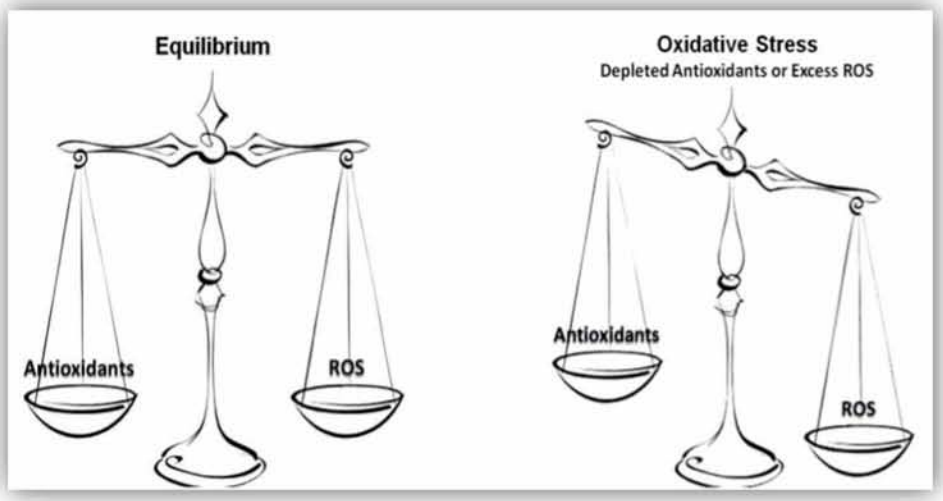
Εικόνα 4: Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).

1.4. Οξειδωτικό Στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Στην περίπτωση που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου
και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο που ορίζεται ως **οξειδωτικό στρες** (Pisoschi and Pop,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση (Εικ.5).



Εικόνα 5: Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.

1.5. Αντιοξειδωτική Ουσία

Ο ανθρώπινος οργανισμός, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, λόγω της συνεχούς έκθεση σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες. Ως **αντιοξειδωτική ουσία** ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους.

α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.

β) Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.

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

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

1.5.1. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- Αντιοξειδωτικά ένζυμα
- Αντιοξειδωτικά μέταλλα
- Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

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

1.5.2. Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά συστήματα. Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά τα οποία μπορεί να παράγει από μόνος του ο οργανισμός και ταξινομούνται σε ενζυμικά ή μη ενζυμικά.

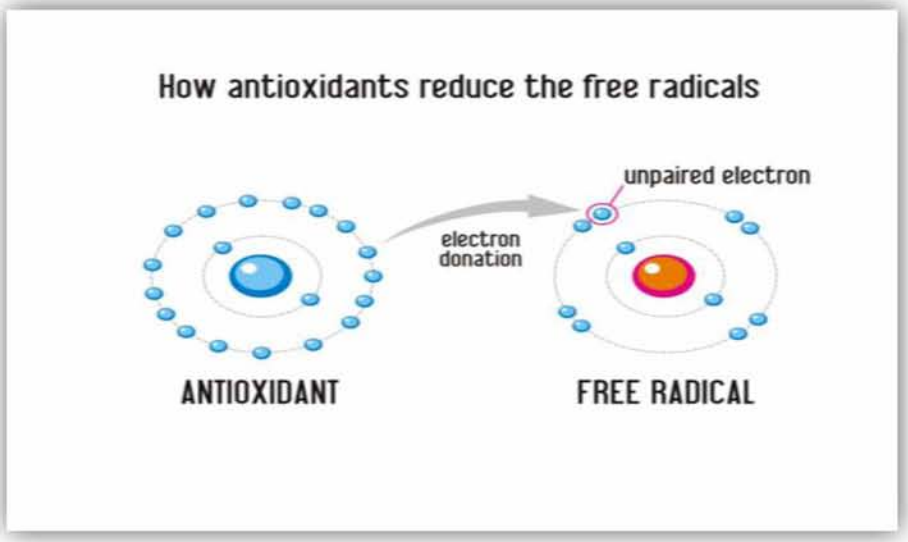
Ενζυμικά αντιοξειδωτικά θεωρούνται το κυτόχρωμα C, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης και η καταλάση. Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται η α-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο και το συνένζυμο Q10 τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις μεμβράνες ενώ, υπάρχουν και το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η τρανσφερίνη, η χολερυθρίνη, η γλουταθειόνη, η λακτοφερίνη κ.α. τα οποία βρίσκονται έξω από τις μεμβράνες.

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.5.3. Εξωγενή Αντιοξειδωτικά

Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki et al., 2003). Επιπλέον, διάφορα ιχνοστοιχεία αποτελούν εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως ο ψευδάργυρος (Zn), ο χαλκός (Cu) και το μαγνήσιο (Mg) (Εικ.6).



Εικόνα 6: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Markoulis et al., 2006). Σημαντική, θεωρείται η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό ανιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και το αιματο-εγκεφαλικό φράγμα και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH, O^{2-} και NO. Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak, 2011a).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.6. Διαταραχές υγείας – Οξειδωτικό Στρες

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

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας αποτελώντας έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler et al., 2015). Γενικότερα, σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Valko et al., 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, 2011b) (Εικ.7)

Εικόνα 7: Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.6.1 Διαταραχές στην υγεία των ζώων – Οξειδωτικό Στρες

Αρκετές μελέτες όπως και η παρούσα οι οποίες διεξήχθησαν σε κτηνοτροφικά ζώα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, διάφορες παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή αναπνευστικού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία, εντερίτιδα (Miller et al. 1993), πυρετός (Kataria A.K. 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu & Eriksson 2001) και υποτροπιάζουσα απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton, Marlin, Smith, Pat A Harris, et al. 2004), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss et al., 2004), πανώλη (Peste des petits ruminants) (PPR) (Kataria A.K. 2012α), πνευμονία (Wessely-Szponder et al. 2004) και μολύνσεις από παράσιτα προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες (Celi, 2011), ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους (Hogan et al. 1992; Deaton, Marlin, Smith, Patricia A Harris, et al. 2004). Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain & Flora 2012) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες. Για παράδειγμα, ο απογαλακτισμός είναι μια αγχωτική περίοδος για τα γουρούνια, με αποτέλεσμα την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων (γαστρεντερικές διαταραχές) που σχετίζονται άμεσα με τους μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στο χοιρίδιο κατά την περίοδο εκείνη (Zhu et al. 2012; Boudry et al. 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.7. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Camire, 2002)(Bidlack et al. 2000; Meskin et al. 2002).

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

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

1.7.1 Πολυφαινόλες

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

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

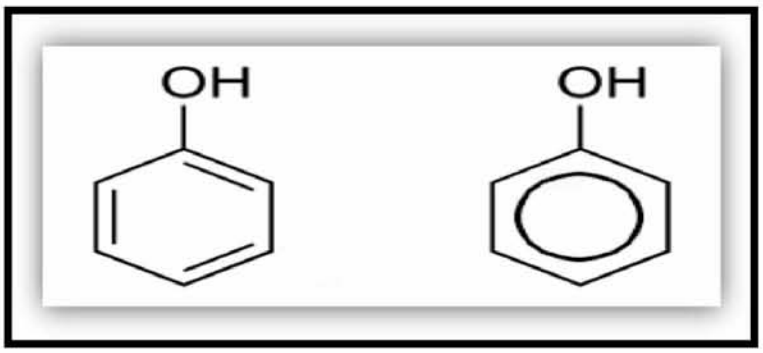
al., 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών. Πολλές από αυτές τις φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για το ελκυστικό χρώμα των φύλλων, των φρούτων, των λουλουδιών (Hermann, 1993) και για αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία και από τη σήψη, την η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και τη συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003).

1.7.2. Φυσικές Ιδιότητες

Οι πολυφαινόλες διαθέτουν μοριακό βάρος και βρίσκονται συνήθως σε υγρή ή σε στερεή μορφή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους είναι υδατοδιαλυτές και τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, σε αντίθεση με τις αλκοόλες του ιδίου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν. Επίσης, υπάρχουν και λιποδιαλυτές πολυφαινόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

1.7.3. Χημική Δομή-Ιδιότητες

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH, το απλούστερο των φαινολών (Εικ.8)



Εικόνα 8: Δομή μιας φαινόλης.

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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

1.7.4 Ταξινόμηση Πολυφαινολών

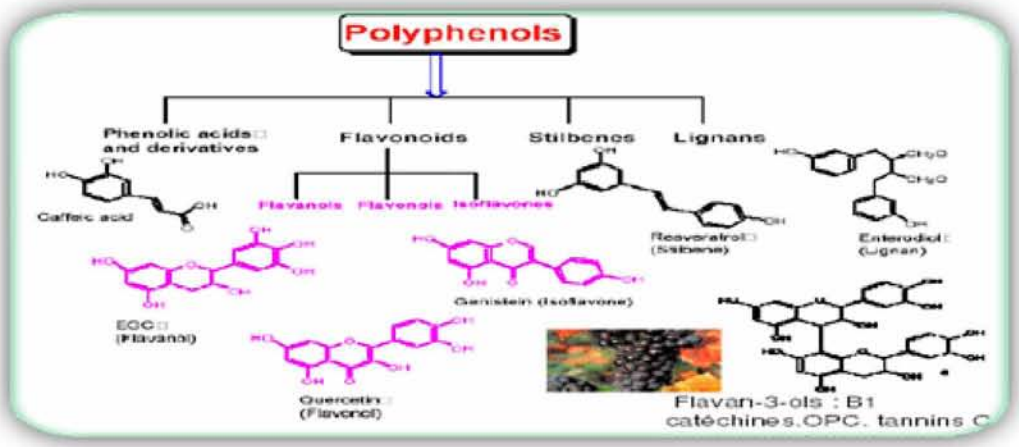
Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Mennen et al., 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στου δακτυλίους τους (Εικ.9). Επομένως, οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

- **Φλαβονοειδή**. Αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006).
- **Φαινολικά οξέα**. Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, οι φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, ο καφές, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα.
- **Ανθοκυανίνες**. Είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που μας παρέχουν προστασία από τις φλεγμονές, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους. Στην ουσία σε αυτές οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου Ι και τύπου ΙΙ) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

- **Λιγνάνες**. Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λάχανο και ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (Naghma, K., et al., 2007). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007).
- **Στιλβένια**. Έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη με ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιφλεγμονώδη δράση. Τα στιλβένια υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα και σε άλλες φυτικές τροφές. (Soleas et al., 1997). Επίσης, βρίσκεται και σε μικρές ποσότητες στο κόκκινο κρασί(Manach et al., 2004) γι' αυτό και σχετίζεται άμεσα με το «Γαλλικό παράδοξο». Η δράση τους είναι πολύ σημαντική κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη.



Εικόνα 9: Είδη πολυφαινολών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Το μέγεθος όλων αυτών των πολυφαινολών ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους.

1.8. Το «Γαλλικό» Παράδοξο

Το 1992 οι γιατροί Renaud και De Lorgeril καθιέρωσαν με μία εργασία τους στο Lancet (από τα πλέον έγκυρα ιατρικά περιοδικά) τον όρο «Γαλλικό παράδοξο» ("French Paradox"). Το γαλλικό παράδοξο είναι η αντίφαση μεταξύ της επιστημονικής θεωρίας και των πραγματικών γεγονότων. Ως «Γαλλικό παράδοξο» εννοούμε τη φαινομενική συμβατότητα δίαιτας υψηλής σε λιπαρά με χαμηλή συχνότητα στεφανιαίας αρτηριοσκλήρυνσης. Από στατιστικές έρευνες είχε διαπιστωθεί ότι οι Γάλλοι διέτρεχαν μικρότερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (ισχαιμικά επεισόδια) σε σχέση με άλλους Βορειοευρωπαίους, αν και κατανάλωναν περισσότερο κρέας και λιπαρές ύλες κατά κεφαλήν. Η ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της έρευνας αναφερόταν για πολλά χρόνια σε εφημερίδες και περιοδικά, προκαλώντας αναταραχές στην κυβέρνηση των ΗΠΑ. Συγκεκριμένα, με βάση τα πρότυπα των ΗΠΑ, οι Γάλλοι κάνουν τα πάντα λάθος από άποψη υγείας. Έχουν μια διατροφή υψηλή σε λιπαρά, δεν τρέχουν και καπνίζουν, όμως έχουν το μισό ποσοστό σε καρδιακές παθήσεις και ζουν περισσότερο. Αυτό, είπαν ότι οφείλεται στο υψηλότερο επίπεδο κατανάλωσης κόκκινου κρασιού στη Γαλλία.

Ως αποτέλεσμα, οι πωλήσεις κόκκινου κρασιού αυξήθηκαν δραματικά σε σχέση με το λευκό κρασί, ενώ συγχρόνως δημιουργήθηκε η μάλλον αφελής εντύπωση ότι "όσο πιο πολύ κόκκινο κρασί τόσο το καλύτερο", που μπορεί να οδηγήσει στον αλκοολισμό με αρκετά οδυνηρές συνέπειες. Τελικά, κλινικές έρευνες έδειξαν ότι δεν είναι μόνο το κρασί αλλά και μία σειρά διατροφικών συνηθειών και άσκησης σε καθημερινή βάση που δημιουργεί τις προϋποθέσεις για μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών νόσων.

1.9. Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικές Δράσεις

Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ. αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio et al., 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπρόσθετα. προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα, ενώ η αιτία που αναπτύσσουν τις επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητές τους είναι η εμπλοκή τους σε οξειδωτικές μεταβολές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach *et al*. 2004; Di Carlo *et al*. 1999; Harborne 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών έχουν την ικανότητα να παρέχουν προστασία έναντι της σήψης.

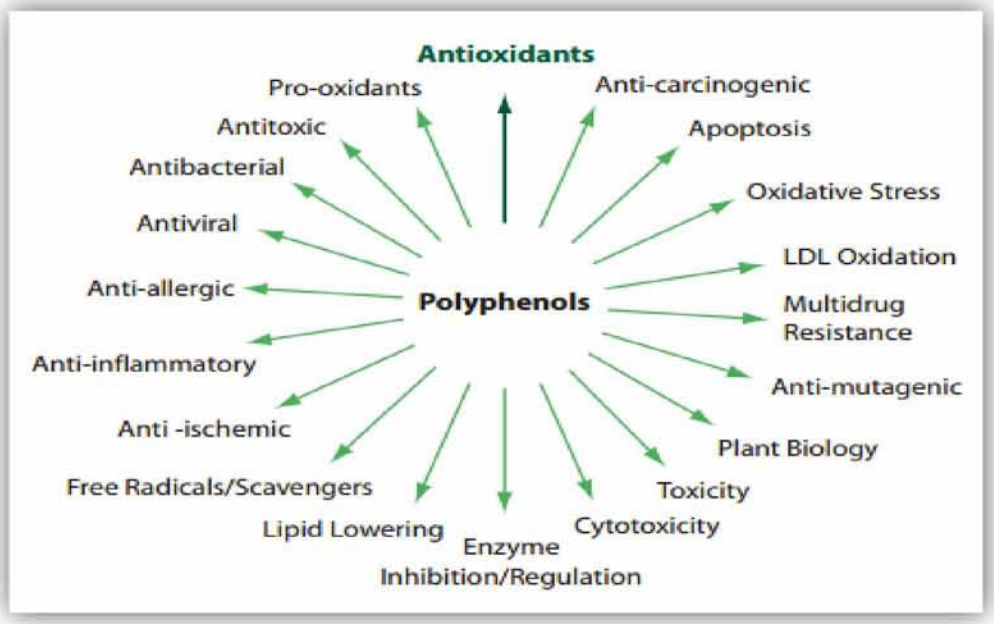
1.9.1 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen et al., 2005). Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αναστολείς των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων (εικ.10) Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001). Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Bouayed&Bohn, 2010; Rodrigo, Libuy, Feliu, &Hasson, 2014). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των φυσικών διατροφικών πολυφαινολών στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας και έχει τονιστεί ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτές οι ουσίες στον περιορισμό των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης. Πολυφαινόλες όπως η ρεσβερατρόλη, επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η κουρκουμίνη έχουν αναγνωριστεί και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή υγεία, ενώ ορισμένες έχουν επίσης δειχθεί ότι είναι προστατευτικές ενάντια στη γήρανση (Sandhya, K., et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Επομένως, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert et al. 2005).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168



Εικόνα 10: Προστατευτική δράση πολυφαινολών.

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

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

1.10.1 Ελαιοευρωπεΐνη

Η ελαιοευρωπεΐνη, είναι ένας γλυκοζίτης και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (Olea europaea), από την οποία και πήρε το όνομά του. Η ελαιοευπρωπεΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco στο ελαιόλαδο. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

(υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Guiso and Marra, 2005). Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη αυτή και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως και διάφορα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της "συγκόλλησης" των αιμοπεταλίων. Η ελαιοευρωπεΐνη και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν προστατευτική δράση, κυρίως αντιοξειδωτική (Βαλαβανίδης, et al., 2007).

Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη Ε) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του ελαϊκού οξέος, εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες συνεπώς και το οξειδωτικό στρες των αερόβιων οργανισμών (Visioli et al., 1998). Αυτή η αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση, όπως και άλλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου. Επιμέρους συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βαννιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Στο ελαιόλαδο υπάρχουν και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες (Papadopoulos, GK., et al., 1991).

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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

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

1. **Στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος**. Τα αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (TC) και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL-C), έχουν καθιερωθεί ως παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, η οποία μάλιστα είναι η κύρια αιτία της καρδιαγγειακής νόσου (CVD). Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, τα υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL-C) πιστεύεται ότι έχουν προστατευτικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες(Gordon et al., 1981). Τα αποτελέσματα από ανθρώπινη μελέτη, δείχνουν ότι βρέθηκε μείωση της TC σε σχέση με την HDL-C, η οποία προήλθε από κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου πλούσιο σε πολυφαινολικά συστατικά. Σημειώνεται επίσης μία αύξηση στην HDL-C με την αυξημένη φαινολική συγκέντρωση του ελαιολάδου (Covas et al., 2006).
2. **Στην οξείδωση των λιπιδίων.** Η οξείδωση της LDL (ox-LDL) θεωρείται ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου(Witztum, 1994). Η οξείδωση της LDL προκαλεί βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα, το οποίο διεγείρει την πρόσληψη των μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος (Fito et al., 2005; Vissers et al., 2001). Διάφορες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (in vivo) έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο η LDL οξειδώνεται, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών (Covas et al., 2006; Nicolaiew et al., 1998; Ramirez-Tortosa et al., 1999).
3. **Στην οξειδωτική καταστροφή του DNA.** Η οξειδωτική βλάβη στο DNA είναι ένα πρόδρομο γεγονός για την ανθρώπινη καρκινογένεση και είναι γνωστό ότι ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν συνεχώς τα ανθρώπινα κύτταρα (Cooke et al., 2003). Σε αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη συστατικών ελαιολάδου πλούσιο σε πολυφαινόλες μειώνει τις βλάβες στο DNA μέχρι και 30% σε σύγκριση με πρόσληψη ελαιολάδου το οποίο είναι φτωχό σε πολυφαινόλες (Salvini et al., 2006).
4. **Σε δείκτες φλεγμονής.** Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής στον ορό σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η θρομβοξάνη Β2 του πλάσματος (TXB2) και το λευκοτριένιο Β4 (LTB4) είναι γνωστοί ως προ-φλεγμονώδεις παράγοντες. Η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

TXB2 έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του αίματος και το LTB4 έχει χημειοστατική επίδραση επί των ουδετερόφιλων, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε κατεστραμμένο ιστό (Bogani, Galli, Villa, &Visioli, 2007; Reinischetal., 1998). Αυτοί οι παράγοντες είναι γνωστό ότι παράγουν τον πόνο, την ερυθρότητα και το οίδημα που σχετίζεται με φλεγμονή. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε μία μείωση στις συγκεντρώσεις των TXB2 και LTB4 όταν υπήρχε αυξανόμενη συγκέντρωση πολυφαινολών ελαιολάδου (Visioli et al., 2005; Weinbrenner et al., 2004).

5. **Στην κυτταρική λειτουργία.** Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η καταστολή του κυτταρικού θανάτου είναι βασικοί παράγοντες για το σχηματισμό όγκων και την εξέλιξη αυτών (Evan and Vousden, 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι η φαινόλη του ελαιολάδου υδροξυτυροσόλη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 και σε ανθρώπινες σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. Έρευνες δείχνουν ότι ο β-υποδοχέας οιστρογόνου έχει μια προστατευτική επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ο β-υποδοχέας οιστρογόνου είναι ο κύριος υποδοχέας οιστρογόνου και εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο από την κανονική βλεννογόνο ανθρώπινου εντέρου. Η έκφραση του β-υποδοχέα οιστρογόνου συνδέεται με την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλούν οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιολάδου, οι οποίες δρουν σαν αντικαρκινικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι περισσότερες φαινόλες έχουν χημική δομή παρόμοια με αυτήν της 17 β-οιστραδιόλης (κύρια μορφή του οιστρογόνου στον άνθρωπο) και μπορούν να είναι προστατευτικές έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου ενεργώντας ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνου (Sukhsatej, B., 2014).

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.12. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου στο περιβάλλον

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

Τα σημαντικότερα από τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων που είναι τα παρακάτω:

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

Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων δεν βιοαποδομείται εύκολα αφού αποτελείται από ενώσεις άμεσα διασπώμενες (σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, πρωτεΐνες) και από ενώσεις δύσκολα διασπώμενες (μεγαλομοριακές λιπαρές ουσίες, πολυφαινόλες). Επίσης, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όπως η υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους φυσικούς αποδέκτες στους οποίους διατίθενται. Προκαλούν την εμφάνιση βιοτοξικών και φυτοτοξικών φαινομένων και η ανεξέλεγκτη διάθεσή τους προκαλεί υποβάθμιση των φυσικών συστημάτων. Επιπλέον, τα απόβλητα των ελαιοτριβείων περιέχουν και πολλά ανόργανα συστατικά όπως ενώσεις αζώτου και φωσφόρου, νάτριο, κάλιο, σίδηρο, κ.α. Τα ανόργανα αυτά συστατικά όπως γνωρίζουμε δεν είναι τοξικά, όμως η μεγάλη συγκέντρωσή τους και η συνεχής και επαναλαμβανόμενη διάθεσή τους μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο περιβάλλον.(Arapoglouetal., n.d.; Ciceraleetal., 2009; Frankel, Bakhouche, Lozano-Sanchez, Segura-Carretero, &Fernandez-Gutierrez, 2013; Tsao, 2010; Περιβάλλοντος & Σχεδιασμού, n.d.)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.13. Γενικές Πληροφορίες για τα Πρόβατα

Για την διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν πρόβατα ως πειραματικά μοντέλα και στη συνέχεια θα ακολουθήσουνε κάποιες χρήσιμες όσον αφορά τα συγκεκριμένα αυτά ζώα.

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

1.13.1 Χαρακτηριστικά

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

1.13.2 Εγκυμοσύνη

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

1.13.3 Το «Χιώτικο» πρόβατο

Το Χιώτικο πρόβατο, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, προήλθε από το ομώνυμο νησί της Χίου, στην περιοχή του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Αποτελεί διασταύρωση ομοιόμαλλου, λεπτόουρου, ελληνικού πρόβατου με παχύουρο, αναμικτόμαλλου, μικρασιάτικου πρόβατου. Τελικά, κατατάσσεται στα ομοιόμαλλα, παχύουρα πρόβατα. Λέγεται ότι παλαιότερα κτηνοτρόφοι της νήσου Χίου και της Ανατολίας, περιοχής της Μικράς Ασίας προχώρησαν σε προσμίξεις μεταξύ των ντόπιων φυλών και των φυλών Kivircik και Daglic. Το Χιώτικο πρόβατο είναι σχετικά μεγαλόσωμο με σωματικό βάρος προβατίνων 45-65 κιλά και κριαριών 65-85 κιλά. Θεωρείται η καλύτερη ελληνική φυλή λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής. Ο χρωματισμός του είναι λευκός με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος στο κεφάλι γύρω από τα αυτιά, τα μάτια, στην κοιλιά και στα πόδια. Τα αρσενικά διαθέτουν κέρατα με μεγάλη σπείρα ενώ τα θηλυκά, όταν έχουν κέρατα, είναι μικρά σαν ένα εξόγκωμα. Το Χιώτικο πρόβατο έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για τη γενετική βελτίωση άλλων ελληνικών και ξένων φυλών με πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής.

1.14. Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών

Τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της κτηνοτροφικής και ζωικής παραγωγής αλλά και την ευζωία των ζωικών οργανισμών, η ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών φυτικής και ζωικής προέλευσης, ως πρόσθετες ύλες, για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, αφού σε αυτά αποδίδεται μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών.

Με τον όρο ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου.

Στην ηλικία απογαλακτισμού τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας, που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα ενήλικα, με αποτέλεσμα εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού να θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών που θα έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγηση λοιπόν αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Πρόσφατα, το ερευνητικό ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί προς τις ευεργετικές ιδιότητες των υποπροϊόντων της επεξεργασίας της ελιάς (Υ.Α.Ε), λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες όπως προαναφέρθηκε. Για το λόγο αυτό, η δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών και η εισαγωγή τους στην καθημερινή διατροφή είναι αρκετά σημαντική, ειδικότερα όμως στα πρώτα στάδια μετά την γέννησή όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Έτσι, οι πολυφαινόλες από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών με σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες, τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και φυσικά στην αύξηση της παραγωγικότητάς τους.

Τέλος δεδομένου του ότι υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, τα οποία παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της ελιάς, είναι ρυπογόνα και με την εκμετάλλευση τους για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών μπορούμε ταυτόχρονα να μειώσουμε το περιβαλλοντικό αποτύπωμά τους.

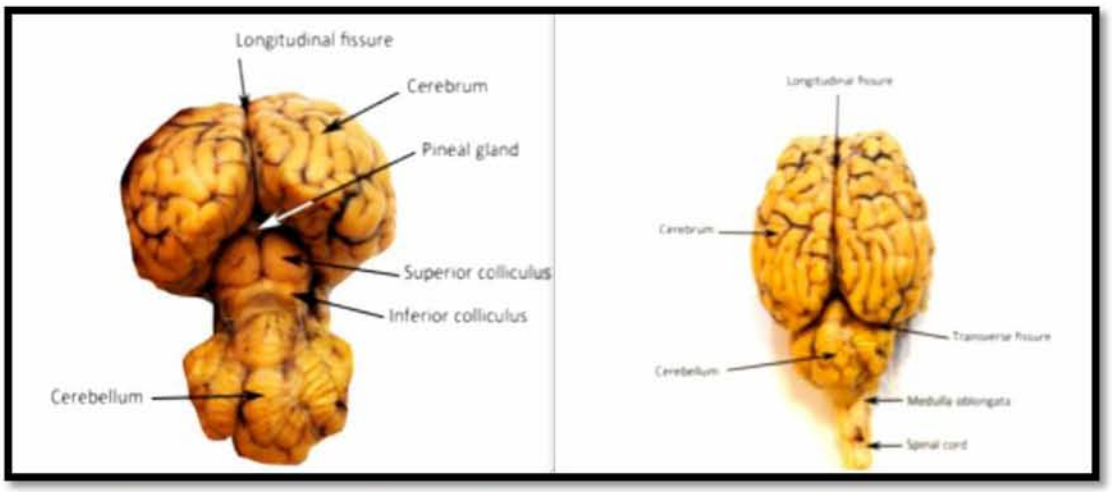
1.15. Γενικές πληροφορίες για τον εγκεφαλικό ιστό

Ο εγκέφαλος των προβάτων σε σχέση με αυτόν του ανθρώπου είναι αρκετά μικρότερος αλλά να παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά. Το στέλεχος του εγκεφάλου είναι συνέχεια του νωτιαίου μυελού και διακρίνεται από τον προμήκη μυελό, στον οποίο εντοπίζονται τα αντανακλαστικά κέντρα που ελέγχουν την αναπνοή και το καρδιαγγειακό σύστημα, τη γέφυρα, το τετράδυμο πέταλο, τα εγκεφαλικά σκέλη, το θάλαμο και τον υποθάλαμο. Από αυτόν ξεκινούν και τα εγκεφαλικά νεύρα όπως τα αισθητικά, τα κινητικά και τα μεικτά νεύρα (Εικ.11). Ο εγκέφαλος είναι ένα όργανο, με τον υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης οξειδωτικής βλάβης και αυτό γιατί περιέχει μεγάλες ποσότητες ακόρεστων λιπιδίων και χρησιμοποιεί περίπου το 20% των συνολικών αναγκών O_2. Μερικές από τις παθήσεις του νευρικού συστήματος που χαρακτηρίζουν τους αμνούς είναι:

- η λιστερίωση, η οποία σχετίζεται με την κακής ποιότητας ενσίρωση,
- οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την πρόκληση βλαβών στην περιοχή του θαλάμου και επηρεάζουν την όραση και την ισορροπία (NADIS, 2015)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- και η υποξική- ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, που οφείλεται στην αλλαγή του μεταβολικού ρυθμού του εγκεφάλου λόγω οξειδωτικού στρες στα έμβρυα (Tomoaki Ikeda et al., 1999).



Εικόνα 11: Ανατομία εγκεφάλου προβάτων.

Ο εγκέφαλος δεν είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, καταλάση, γλουταθειόνη, υπεροξειδάση). Περισσότερο εμπλουτισμένα σε γλουταθειόνη είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία έχουν και μεγαλύτερη δραστικότητα SOD, γι' αυτό και η αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο έχει συσχετιστεί με τη χαμηλή δραστικότητα της γλουταθειόνης (Tomoaki Ikeda et al., 1999).

1.16. Γενικές πληροφορίες για τον τετρακέφαλο μυ

Όσον αφορά τον τετρακέφαλο ιστό, διαθέτει αρκετά ενδογενή αντιοξειδωτικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται: η τοκοφερόλη, διπεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη (καρνοσίνη, ανσερίνη), αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση. Παρά την παρουσία αντιοξειδωτικών συστημάτων, η οξείδωση των λιπιδίων στους μυς εμπλέκεται στη μοριακή βάση ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία. Τα λιπίδια στους μυς κυμαίνονται σε μεγάλα όρια (1-20%) και εντοπίζονται κυρίως στο επίπεδο κυτταρικών μεμβρανών, όπως στα μιτοχόνδρια, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και τα μικροσώματα. Επειδή η συγκέντρωση αλλά και η δραστικότητα πολλών ενδογενών αντιοξειδωτικών των μυών μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή του ζώου, κρίνεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

αναγκαία η κατανόηση της σχέσης διατροφής - συνολικού αντιοξειδωτικού τόνου του μυός, τόσο για την μείωση συχνότητας εμφάνισης σοβαρών ασθενειών όσο και για την ενίσχυση της οξειδωτικής σταθερότητας, ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του ζώου.

2. Σκοπός

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, ασχοληθήκαμε με την αξιοποίηση των υποπροϊόντων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα χορηγηθούν σε πρόβατα νεαρής ηλικίας. Το πείραμα αυτό έχει σαν στόχο την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνάς τους που θα οδηγήσει στην βελτιστοποίηση της ευζωίας τους και επομένως στην αύξηση της ζωικής παραγωγής. Από την άλλη, η επεξεργασία των ρυπογόνων υποπροϊόντων των ελαιοτριβείων τα οποία είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά, θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3. Υλικά & Μέθοδοι

3.1. Γενικά

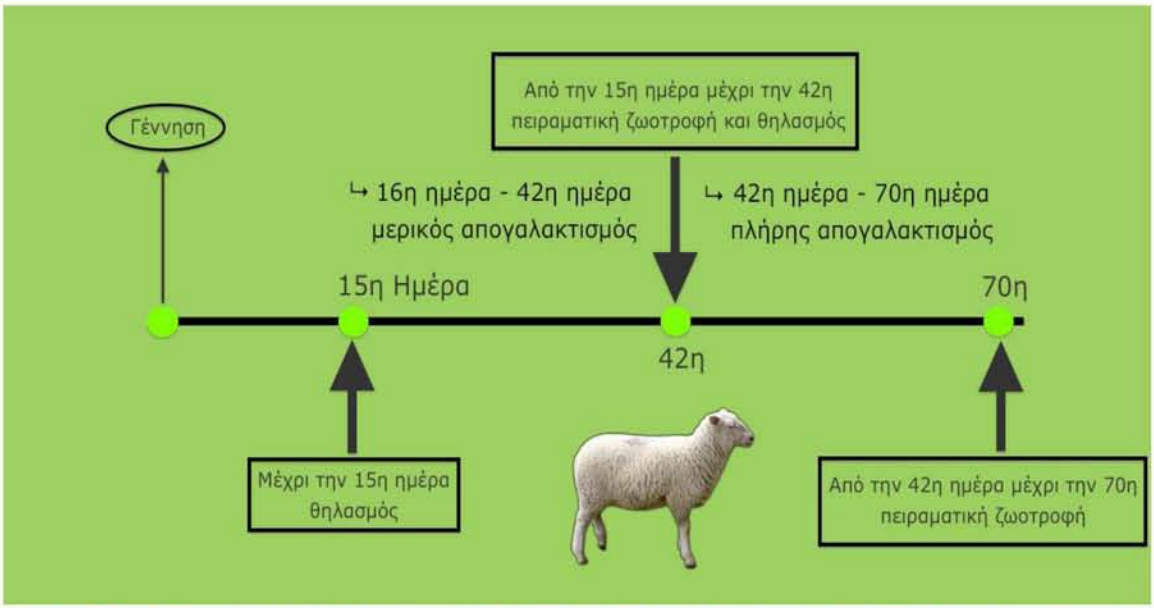
Η εκτροφή των νεαρών προβάτων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Επιστήμης και Ζωικής Παραγωγής στα Γιαννιτσά Πέλλας, με εφαρμογή σιτηρεσίου και συνθηκών ομαλής διαβίωσης και ανάπτυξης. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες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

3.2. Πειραματικό πλάνο

Για την παρούσα εργασία εκτράφηκαν 28 πρόβατα. Τον μήνα Δεκέμβριο γεννήθηκαν 28 αρνιά Ελληνικής «Χιώτικης» φυλής τα οποία παρέμειναν 15 μέρες από τη γέννησή τους με τις μητέρες τους για θηλασμό. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, την Α και την Β. Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 12 πρόβατα σε ομαδικά κελιά. Εκεί είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (τριφύλλι), για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε το σύνηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά σιτηρέσια ήταν ισοενεργά, ισοπρωτεϊνικά, και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αρνιών. Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, τα αρνιά βρίσκονταν με τις μητέρες τους. Στο διάστημα 15-42 ημερών τα αρνιά θήλαζαν και ταυτόχρονα σιτίζονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές. Μια ώρα το πρωί και μια ώρα το απόγευμα τα πρόβατα απομακρύνονταν από τις μητέρες τους, με σκοπό να τραφούν οι μητέρες. Τις υπόλοιπες ώρες της ημέρας, όπως προαναφέρθηκε, τα πρόβατα θήλαζαν και τρέφονταν με τις πειραματικές ζωοτροφές οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε ειδικές ταΐστρες όπου παρευρίσκονταν στο διπλανό χώρο, ο οποίος ήταν ξεχωριστός και τα πρόβατα εισέρχονταν μέσω μιας μικρής πόρτας. Παράλληλα με τις πειραματικές ζωοτροφές και τον θηλασμό τα πρόβατα τρέφονταν με μηδική (τριφύλλι). Στο διάστημα μεταξύ των 42 και 70 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός, απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα πρόβατα τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή (Εικ. 12).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Η λήψη ιστών πραγματοποιήθηκε από τα εξής ζωτικά όργανα: εγκέφαλο και τετρακέφαλο μυ, στις 15, 42 και 70 ημέρες.



Εικόνα 12: Πειραματικό πλάνο εκτροφής – απογαλακτισμού των αναπτυσσόμενων αρνιών.

3.3. Βιολειτουργικές Ζωοτροφές

Η ορθή επιλογή και κατάρτιση των ζωοτροφών απαιτεί την ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπιέζοντας παράλληλα το κόστος παραγωγής. Αυτό ουσιαστικά προϋποθέτει τον ακριβή καθορισμό των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά αλλά και την ακριβή γνώση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών. Για την κατάρτιση των παρακάτω βιολειτουργικών ζωοτροφών, χρησιμοποιήθηκαν συστατικά που περιέχουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες που πληρούν τις ενεργειακές ανάγκες και εξασφαλίζουν την υγεία των προβάτων καθώς επίσης ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση.

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3.3.1 Προετοιμασία Ενσιρώματος ΥΑΕ

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

Για την υποβοήθηση της γαλακτικής ζύμωσης, χρησιμοποιήθηκε στάνταρ εμπορικό σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων που διαλυόταν σε νερό και μετά από μία διαδικασία αναγέννησης γινόταν η προσθήκη του στο υγρό που αναμιγνυόταν με το καλαμπόκι σε κάθε παρτίδα παραγωγής ενσιρώματος. Ζυγίζονταν 1 gr σκόνης λυοφιλιομένων βακτηρίων για κάθε 100 κιλά τελικού ενσιρωμένου προϊόντος. Τα βακτήρια αυτά στην συνέχεια διαλυόταν σε νερό βρύσης μέσω ανάδευσης και θέρμανσης στους 40^{o}C σε αναλογία 1/10w/v, με σκοπό να είναι πλήρως ενεργοποιημένα πριν από την προσθήκη τους στο υγρό της ενσίρωσης. Μετά την προσθήκη της καλλιέργειας και την ανάμιξη, το προς ενσίρωση μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδικές αεροστεγείς πλαστικές σακούλες, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν με θερμοσυγκόλληση αεροστεγώς με χρήση ειδικού μηχανήματος (Εικ.13). Μετά την σφράγιση των σακουλών που περιείχαν το προς ενσίρωση υλικό, το υλικό που βρισκόταν υπό κενό άρχισε με την βοήθεια των λακτοβακίλλων που είχαν προστεθεί σ' αυτό να ζυμώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού οξέως και διοξειδίου του άνθρακα το οποίο διόγκωνε τις πλαστικές σακούλες. Για το λόγο αυτό και για να αποτραπεί η διάρρηξη των σακουλιών και η δημιουργία αερόβιων συνθηκών που δεν ευνοούν την γαλακτική ζύμωση, κάθε δύο με τρείς ημέρες το υλικό υφίστατο εκ νέου συσκευασία σε πλαστικές νέες πλαστικές σακούλες κατά τον ίδιο τρόπο και πάλι υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphenolic), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραίωση του ενσιρώματος με αποσταγμένο νερό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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 1: Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH.

Εικόνα 13: Α. Ζυγαριά ακριβείας, Β. Μηχανή αποσυμπίεσης, Γ. Τελικό πακετάρισμα σιτηρεσίου.

3.3.2 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών Προβάτων

Για τις ανάγκες του πειράματος, παρασκευάστηκαν δυο είδη σιτηρεσίων. Το κανονικό σιτηρέσιο (χορήγηση στην ομάδα Α, ομάδα ελέγχου-Control) και το σιτηρέσιο που είναι εμπλουτισμένο με ενσίρωμα από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (χορήγηση στην ομάδα Β, την πολυφαινολική). Τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προβάτων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Ακολουθεί το πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα πρόβατα της ομάδας Α (Control) και Β (πολυφαινολική), **μέχρι και μετά τον απογαλακτισμό τους.**

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

Πίνακας 2: Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδας Α και Β μέχρι τον απογαλακτισμό τους.

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

Πίνακας 3: Σύσταση παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ομάδας Α και Β μετά τον απογαλακτισμό τους.

Συγκεκριμένα, για το ενσίρωμα ΥΑΕ (ελαιοτριβείου) χρησιμοποιήσαμε:

- 80 κιλά καλαμπόκι αλεσμένο
- 20 λίτρα ΥΑΕ(με 4% στερεά)
- 20 λίτρα H_2O

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3.3.3 Παραγωγική Διαδικασία Ενσιρώματος

Για την ενσίρωση επιλέγονται φυτά με ψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε ξηρή ουσία υψηλής πεπτικότητας και ικανοποιητικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα πλέον κατάλληλα φυτά που προσφέρονται για ενσίρωση είναι το καλαμπόκι και η μηδική.

Αρχικά για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι, το οποίο περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ) και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή.

Η ενσίρωση λοιπόν είναι, η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και κάτω από αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την διάρκεια της ενσίρωσης δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βακτήρια, τα οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια και εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες, τα επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα.

Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν να μετατρέψουν υδατάνθρακες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του Lactobacillus και Streptococcus. Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων. Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος. Για το ενσίρωμα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται ζυμώνουν τους υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες (WSC) στην καλλιέργεια σε γαλακτικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό σε οξικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Η μείωση του pH του ενσιρωμένου υλικού οφείλεται στην παραγωγή αυτών των οξέων με αποτέλεσμα την αναστολή των μικροοργανισμών αλλοίωσης της τροφής. Μόλις η τροφή προς ενσίρωση έχει αποκλειστεί από τον αέρα, η διαδικασία ενσίρωσης μπορεί να διαιρεθεί σε 4 φάσεις (Stefanie, J., et al., 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3.4 Φάσεις Ενσίρωσης

Φάση 1η: Αερόβια Φάση. Η φάση αυτή συνήθως διαρκεί μόνο λίγες ώρες στις οποίες το ατμοσφαιρικό οξυγόνο 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, υπάρχουν τα ένζυμα φυτών όπως πρωτεάσες, ένζυμα που διασπούν υδατάνθρακες και είναι ενεργά κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, εφόσον το pH εξακολουθεί να είναι εντός του φυσιολογικού ορίου για φρέσκο ενσίρωμα (pH 6.5-6.0).

Φάση 2η: Φάση Ζύμωσης. Η φάση αυτή θα ξεκινήσει όταν η ενσίρωση γίνεται πλέον 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, τότε αναπτύσσονται τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, τα οποία 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 3η: Σταθερή Φάση. Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς της δεύτερης φάσης αρχίζουν σιγά-σιγά να μειώνονται. Μερικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξύ επιβιώνουν σε αυτή τη φάση και βρίσκονται σε μια σχεδόν ανενεργή κατάσταση, ενώ κάποιοι άλλοι, όπως clostridia και bacilli επιβιώνουν ως σπόρια. Μόνο μερικές πρωτεάσες και καρβοϋδράσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο οξύ και κάποιοι εξειδικευμένοι μικροοργανισμοί, όπως *Lactobacillus buchneri* συνεχίζουν να είναι ενεργοί σε χαμηλό επίπεδο.

Φάση 4η : 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 συνεπώς το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης έχει πλέον ξεκινήσει, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως οι βάκιλοι. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ως και τούτου, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

Η είσοδος του αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμη και να εμποδίσει την επίτευξη σωστών επίπεδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της ενσιρωμένης 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 έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώσει 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. Εν κατακλείδι, με τη χορήγηση ενσιρώματος αυξάνεται η παραγωγικότητα των ζώων, λόγω καλύτερης διατροφής και συνδυάζεται η γεωργική με την κτηνοτροφική κατεύθυνση της επιχείρησης.

Ένα καλό ενσίρωμα ΥΑΕ πρέπει να:

- διαθέτει ένα ανοικτό καφέ χρώμα,
- έχει μια έντονη γεύση
- μυρίζει ελάχιστα (όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα).
- είναι πολύ σταθερό και
- να μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια (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 του θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό του σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί μέχρι η περιεκτικότητα του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ασφαλέστερη ενσίρωση. Το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

3.5 Αντιοξειδωτική δράση των ζωοτροφών (in vitro)

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

Α. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του **DPPH•**

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

Β. Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του **ABTS+•**

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

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

3.6 Ιστοληψία

Οι σφαγές των προβάτων πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο του Ινστιτούτο Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής Γιαννιτσών ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Οι σφαγές πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένη ηλικία των ζώων με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας στην πρόωρη ηλικία, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία, δηλαδή κατά τον απογαλακτισμό και τέλος, την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (βάρος σφάγιου).

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

3.6.1 Ομογενοποίηση Ιστών

Η ομογενοποίηση των ιστών τόσο του εγκεφάλου όσο και του τετρακέφαλου εκτελέστηκε με ομογενοποιητή. Αρχικά, πήραμε ένα μικρό μέρος του παγωμένου ιστού από το ψυγείο των -80^{o}C και πραγματοποιήθηκε το ζύγισμα των δειγμάτων (ποσότητα ιστού) σε ζυγό ακριβείας, το οποίο έπρεπε να είναι > 0,5g. Στη συνέχεια μέσα σε falcon προσθέσαμε την ζυγισμένη ποσότητα ιστού και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε αναλογία 1:2 και πραγματοποιήσαμε ομογενοποίηση με τον ειδικό ομογενοποιητή (Εικ.14). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με χρήση υπερήχων για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (15.000g, 5min, 4^{o}C). Κατόπιν, πήραμε το υπερκείμενο και το προσθέσαμε σε Eppendorf. Τέλος, αφότου ομογενοποιήθηκαν όλοι οι ιστοί, διατηρήθηκαν στους -80^{o}C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Εικόνα 14: Τα Εργαλεία που Χρησιμοποιήθηκαν για την Ομογενοποίηση Ιστών.

3.7 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

3.7.1 Γενικά

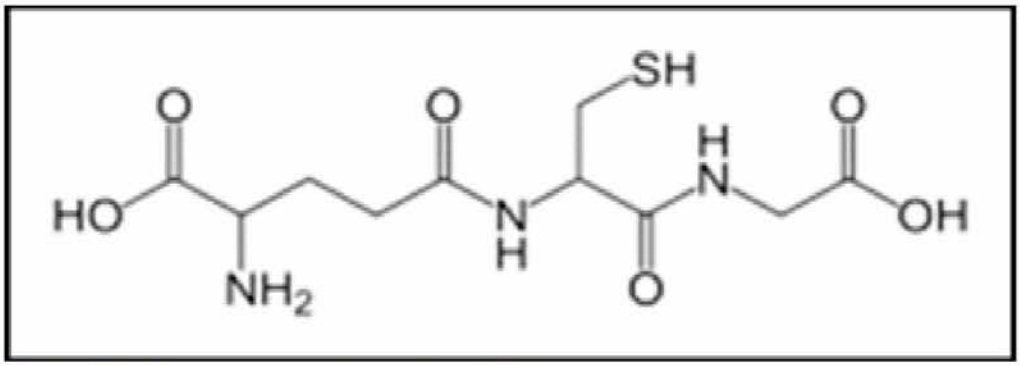
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης, ενώ για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών. Αντίστοιχα, για την αξιολόγηση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

3.7.2 Μέθοδοι

3.7.2.1 Μέτρηση γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων (Εικ15).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168



Εικόνα 15 : Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin and Brumaghim, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των 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).

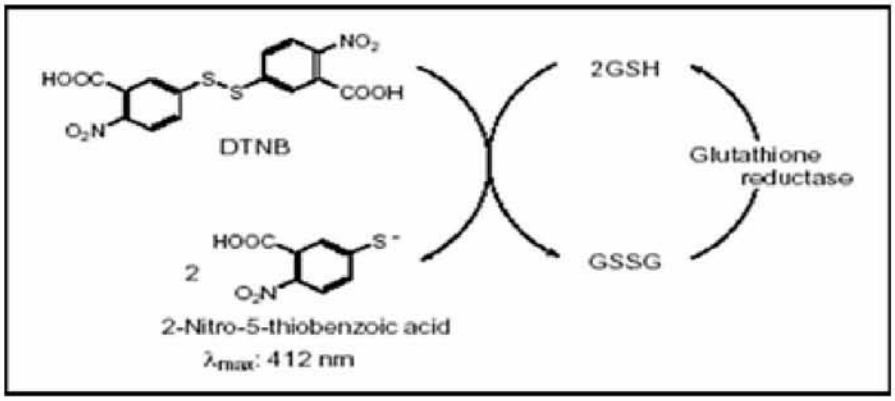
Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτροβενζοϊκό 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., Y.N., 2004).

2 GSH + DTNB → GSSG + 2-nitro-5- thiobenzoicacid

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνη (Εικ.16).



Εικόνα 16: Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 67 mM (pH 7,95).**MB (KH_2PO_4): 136 MB (Na_2HPO_4): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mLKH2PO4 (67 mM) και 500 mLNa_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.

- **DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό.** (39,6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος

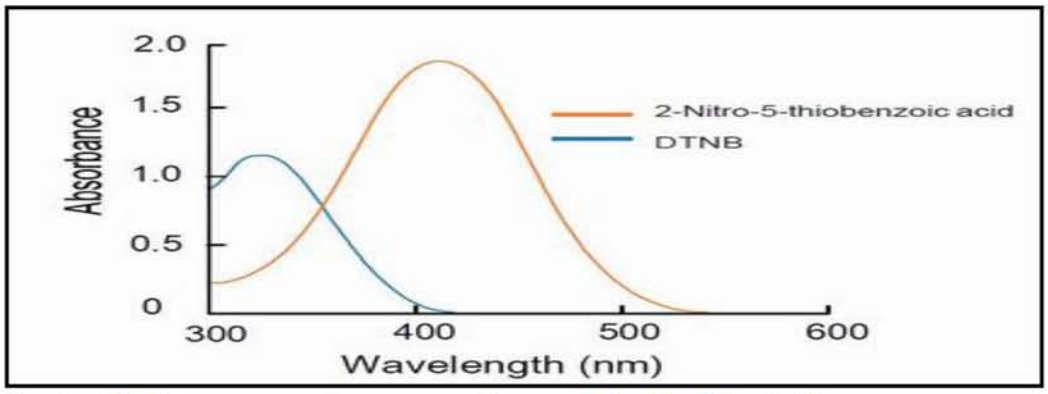
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια eppendorf:

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

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH (Εικ.17). Φυγοκεντρούμε στα 15.000g για 5 min στους 5^{o}C και τέλος μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (BEERS and SIZER, 1952).



Εικόνα 17: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (μmol/mg total prot.) = (Abs δείγματος - Δabstυφλού/13.6) × 2 × 3 (λόγω αραιώσεων) × 50.5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

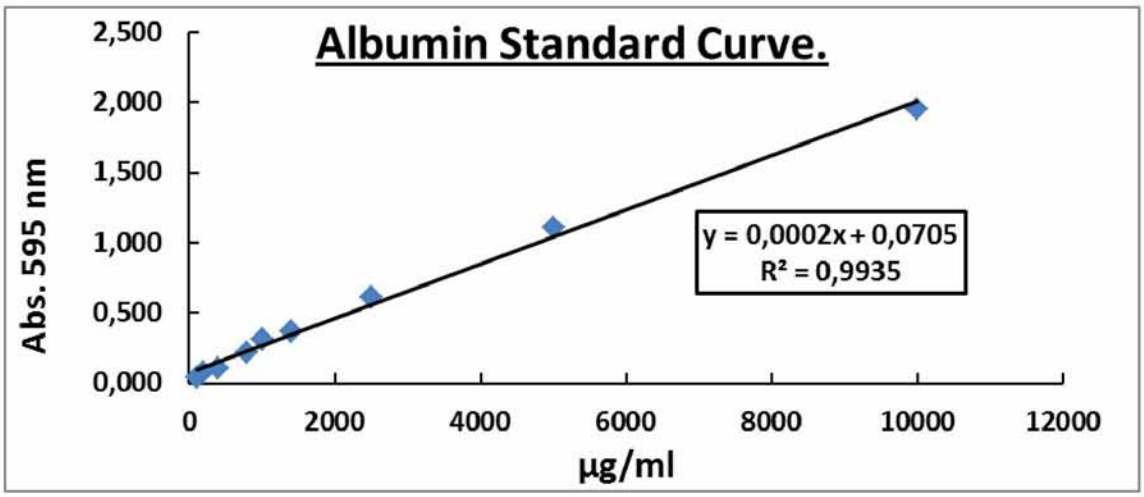
Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

πρώτη αραίωση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον εγκεφαλικό και τον ιστό του τετρακεφάλου για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με εξίσωση y=0,0002x + 0,0705 και R2= 0,9935, όπου ο άξονας y = Abs στα 595 nm και ο x = Συγκέντρωση (μg/ml). Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Αλβουμίνης.

3.7.2.2 Δραστικότητα καταλάσης

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξείδιο 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 et al., 2004) Chelikani. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές 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 H_2O_2. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$.

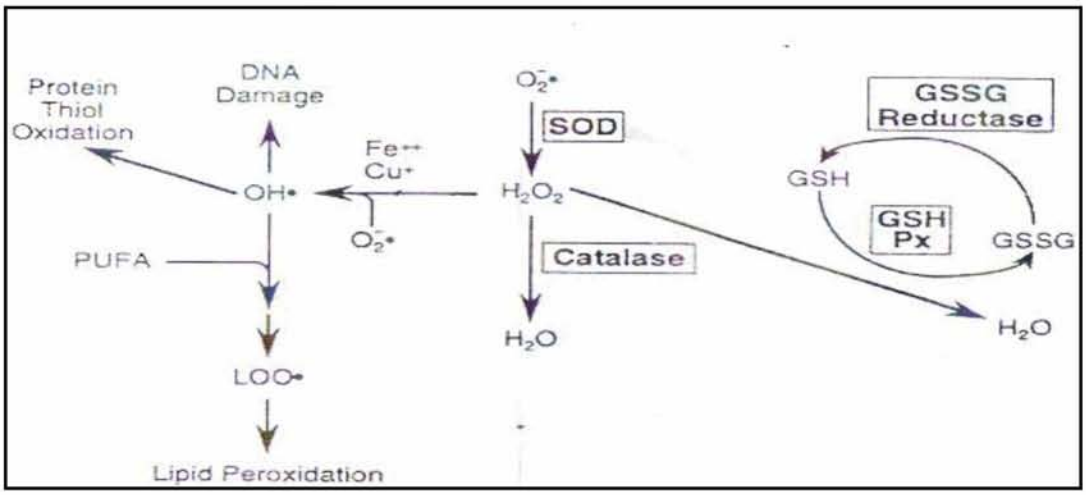
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \rightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}E$

$H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}E \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-}E + O_2$

(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο) (Εικ.18).



Εικόνα 18: 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:

$H_2O_2 + H_2A$ (substrate) $\rightarrow$ $2\,H_2O + A$.

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

Διαλύματα

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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

- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).**
  Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

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

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

Υπολογισμοί

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

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον εγκεφαλικό ιστό και τον ιστό του τετρακεφάλου για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Δ Abs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου16 mM.

U = μmol/min. ΔAbs blank είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού (One Unit decomposes one micromole of hydrogenperoxide per minute at 25 ^{o}C pH 7.0).

3.7.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα

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

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

Αρχή της μεθόδου

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

Διαλύματα

• **Phosphatebuffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH2PO4): 136 και MB (Na2HPO4): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH2PO4 (10 mM) και 400 mL Na2HPO4 (10 mM). Για το KH2PO4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na2HPO4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

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

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

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

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

Πίνακας 6: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για τη μέτρηση της TAC

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

% Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού x 100

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = [(% Abs μείωση / 100) x 50 x 25 x 3 x 5] / 1000.

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

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

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

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

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

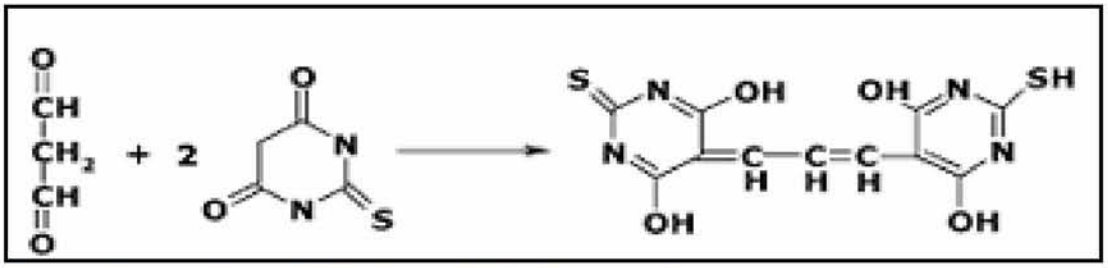
Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: mmol DPPH / mg total prot.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

3.7.2.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΰδη. Η μαλονδιαλδεΰδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Εικ.19). Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΰδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΰδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 19: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

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

Διαλύματα

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

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

• **Διάλυμα Na2SO4 (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na2SO4): 142.04. Για την παρασκευή10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na2SO4 και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή αποσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na2SO4 – TBA και επωάζουμε στους 95 ^{o}C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25^{o}C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον εγκεφαλικό ιστό και τον ιστό του τετρακεφάλου, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 ξανά επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

3.7.2.5 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

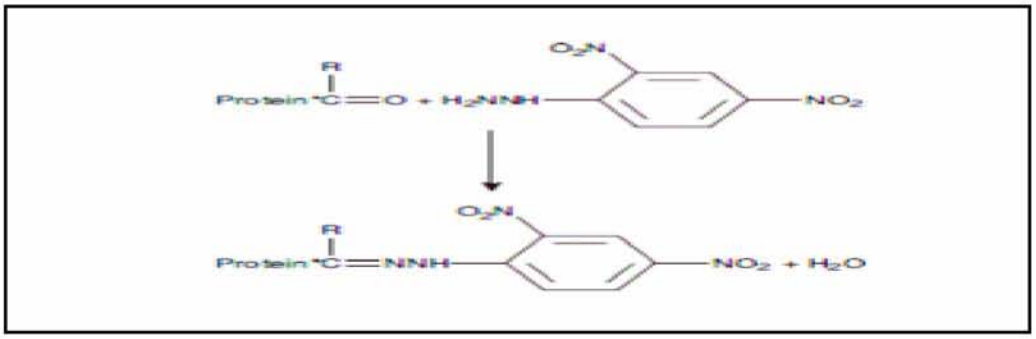
Αρχή της μεθόδου

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

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

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλυδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλυδραζονίου (Εικ.20). Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο (Patsoukis et al., 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168



Εικόνα 20 : Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλυδραζίνη) και σχηματισμός του 2,4-δίνιτροφαινυλυδραζονίου.

Διαλύματα

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

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

• **DNPH 14 mM**. (MB: 198.1)

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

• **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Πειραματικό πρωτόκολλο.

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 ^{o}C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 ^{o}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^{o}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^{o}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 37oC για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4^{o}C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)= Abs δείγματος-Abs τυφλού/0.022×1000/50 x 2 ή 3 x 2/Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM x cm-1. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον εγκεφαλικό ιστό και τον ιστό του τετρακεφάλου, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά).

3.7.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

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

3.8. Στατιστική ανάλυση

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τα πρόβατα

Είναι γνωστό ότι όσο μικρότερο το IC50, τόσο καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχουν οι ζωοτροφές. Παρατηρήθηκε ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα ελαιοτριβείου (YAE), παρουσιάζει τιμή IC_{50} = 12,4 mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου παρουσιάζει τιμή IC_{50} = 25,5 mg/ml. Κατά συνέπεια, η ζωοτροφή με τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (YAE), παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα σχεδόν διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 6).

Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS οι τιμές IC_{50} που παρατηρήθηκαν στη ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντων ελαιοτριβείου (YAE) είναι IC_{50} = 7,1 mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου είναι IC_{50} = 12 mg/ml. Γενικά οι τιμές IC50 είναι πιο χαμηλές σε σύγκριση με αυτές της ρίζας του DPPH, το οποίο οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Έτσι, και από τις δύο μεθόδους συμπεραίνεται ότι η δραστικότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (YAE) είναι σχεδόν διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

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

Πίνακας 7: Συνολικά αποτελέσματα της αποτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ζωοτροφών

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

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4.1.1. Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών των προβάτων.

Από αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, παρατηρήθηκε μια αύξηση του σωματικού βάρους των αρνιών των ομάδων που κατανάλωσαν τροφή με Υ.Α.Ε σε σχέση με την ομάδων Control μέχρι και τις 42 ημέρες από τη γέννησή τους. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στις 29 και 42 ημέρες μετά τη γέννηση. Αντίθετα, από το διάστημα των 42 έως 70 ημερών παρατηρήθηκε μια σταθερότητα στο βάρος των αρνιών μεταξύ των ομάδων Control και Υ.Α.Ε. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην ημερήσια μεταβολή του σωματικού βάρους των αρνιών που κατανάλωσαν τροφή εμπλουτισμένη με Υ.Α.Ε σε σχέση με την ομάδων Control από τη γέννηση μέχρι και τις 42 ημέρες, ενώ από το διάστημα των 42 μέχρι 70 ημερών και το διάστημα από τη γέννησή τους μέχρι και τις 70 ημέρες δεν υπήρξε καμιά στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων Control και Υ.Α.Ε.

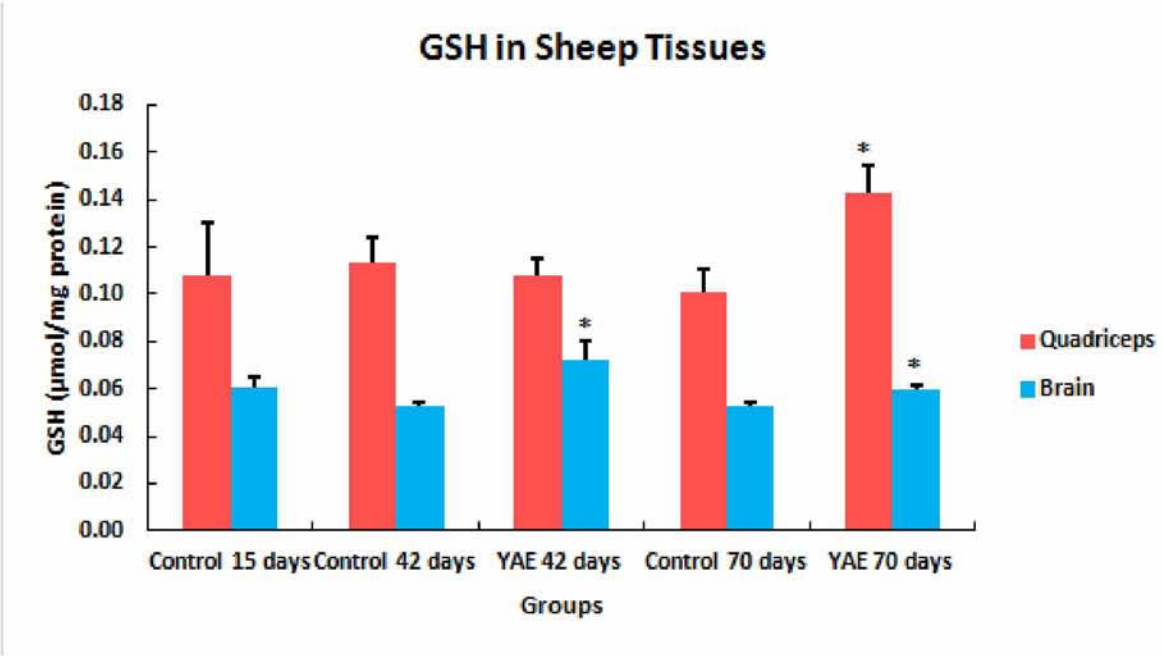
Όσον αφορά την Μέση Ημερήσια Κατανάλωση των δύο ζωοτροφών, αυτή δεν παρουσίασε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή μεταξύ των δύο ομάδων Control και ΥΑΕ σε καμία από τις δύο φάσεις του πειραματισμού.

4.2. Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στον ιστό του εγκεφάλου και του τετρακέφαλου μυ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους δύο ιστούς των προβάτων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία φαίνονται στα παρακάτω συγκεντρωτικά διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται μεταξύ της ομάδας Control και της πολυφαινολικής (ΥΑΕ) για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δυο βιολειτουργικών ζωοτροφών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4.2.1 Αποτελέσματα Γλουταθειόνης (GSH)



Διάγραμμα 2: Μεταβολή στη συγκέντρωση της GSH στους ιστούς (τετρακέφαλο και εγκέφαλο), μεταξύ των ομάδων Control & YAE στις ίδιες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές *p < 0.05 ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

Παρατηρήσεις:

↳ Ιστός Τετρακεφάλου

GSH (μmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	0.108 ± 0.022	0.113 ± 0.011	0.101 ± 0.009

Πίνακας 8: Επίπεδα GSH, στον ιστό του τετρακέφαλου για στις ομάδες Control.

GSH (μmol/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	0.108 ± 0.007	0.143 ± 0.012

Πίνακας 9: Επίπεδα GSH, στον ιστό του τετρακέφαλου στις πολυφαινολικές ομάδες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της GSH από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Στις 70 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** αύξηση κατά 40.8% της GSH από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
Control	0.113 ± 0.011	0.101 ± 0.009
Πολυφαινολικά	0.108 ± 0.007	0.143 ± 0.012

Πίνακας 10: Επίπεδα GSH, στον ιστό του τετρακεφάλου στα πολυφαινολικά και στα Control ζώα.

↳ Ιστός Εγκεφάλου

GSH (μmol/mg protein)	**15 ημέρες**	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
M.O. ± SEM	0.061 ± 0,004	0.052 ± 0.002	0.053 ± 0.002

Πίνακας 11: Επίπεδα GSH, στον ιστό του εγκεφάλου στα Control ζώα.

GSH (μmol/mg protein)	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
M.O. ± SEM	0.072 ± 0.008	0.060 ± 0.002

Πίνακας 12: Επίπεδα GSH, ιστού εγκεφάλου στις πολυφαινολικές ομάδες

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες υπάρχει **στατιστικά σημαντική αύξηση** κατά 36.8% της GSH από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

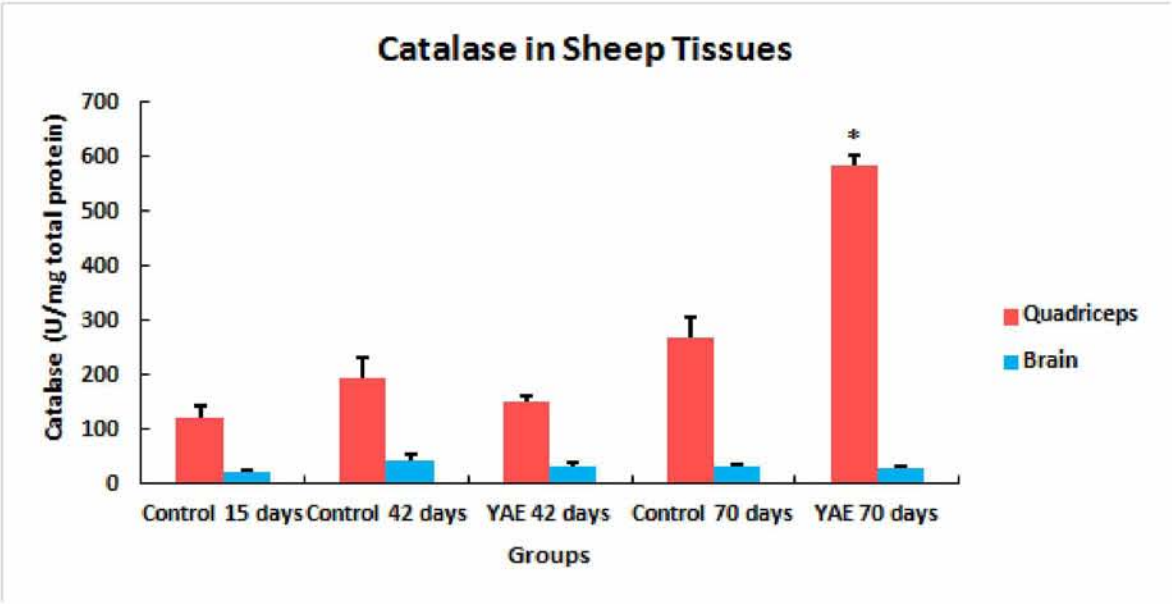
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Στις 70 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική αύξηση** κατά 12.8% της GSH από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
Control	0.052 ± 0.002	0.053 ± 0.002
Πολυφαινολικά	0.072 ± 0.008	0.060 ± 0.002

Πίνακας 13: Επίπεδα GSH, ιστού εγκεφάλου στα πολυφαινολικά και στα Control ζώα.

4.2.2 Αποτελέσματα Καταλάσης (CAT)



Διάγραμμα 3: Επίπεδα δραστικότητας καταλάσης στους ιστούς (τετρακέφαλο και εγκέφαλο), μεταξύ των ομάδων Control & YAE στις ίδιες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές *p < 0.05 ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Παρατηρήσεις:

↳ Ιστός Τετρακεφάλου

CAT (U/mg Protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	123.332 ± 21.332	194.288 ± 36.749	270.664 ± 36.384

Πίνακας 14 : Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του τετρακεφάλου για τις ομάδες Control.

CAT (U/mg Protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	149.381 ± 12.392	586.443 ± 17.719

Πίνακας 15: Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του τετρακεφάλου για τις πολυφαινολικές ομάδες.

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή της CAT από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Στις 70 ημέρες παρατηρείται μία **στατιστικά σημαντική** αύξηση κατά 116.6% της καταλάσης από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	194.288 ± 36.749	270.664 ± 36.384
Πολυφαινολικά	149.381 ± 12.392	586.443 ± 17.719

Πίνακας 16: Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του τετρακεφάλου για τα Control και τα πολυφαινολικά ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

↳ Ιστός Εγκεφάλου

CAT (U/mg Protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	23.046 ± 2.850	43.836 ± 9.503	33.476 ± 3.070

Πίνακας 17: Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του εγκεφάλου για τις ομάδες Control.

CAT (U/mg Protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	31.979 ± 7.763	29.539 ± 2.994

Πίνακας 18: Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του εγκεφάλου για τις πολυφαινολικές ομάδες.

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή της CAT από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

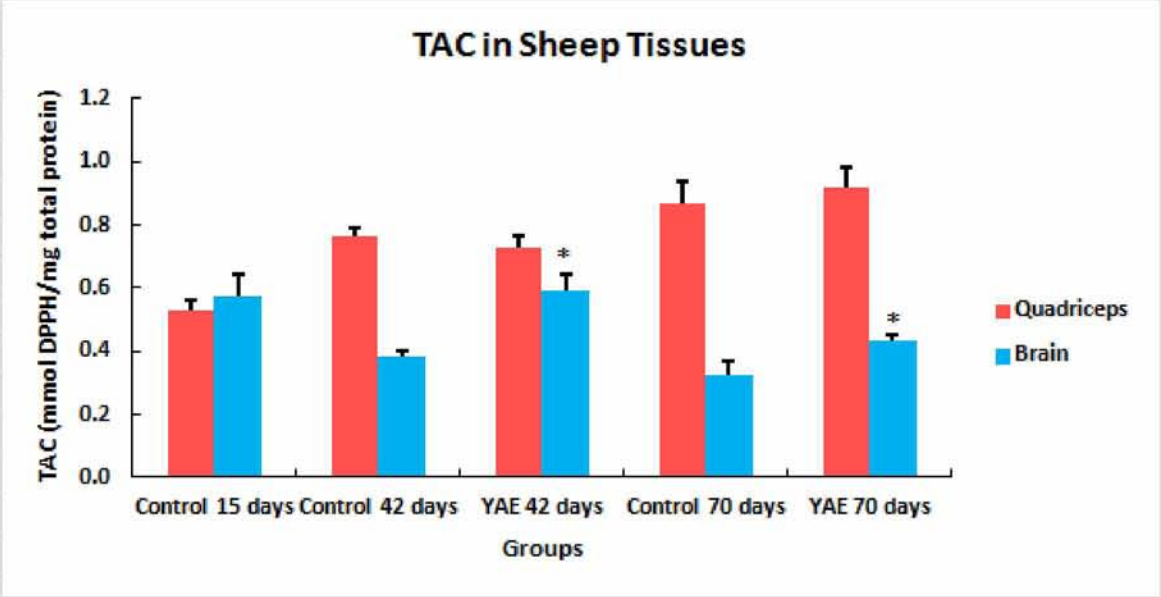
Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή της καταλάσης από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	43.836 ± 9.503	33.476 ± 3.070
Πολυφαινολικά	31.979 ± 7.763	29.539 ± 2.994

Πίνακας 19: Επίπεδα καταλάσης, στον ιστό του εγκεφάλου για τα Control και τα πολυφαινολικά ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4.2.3 Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)



Διάγραμμα 4 : Τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά mg συνολικής πρωτεΐνης, για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC στους ιστούς (τετρακέφαλο και εγκέφαλο), μεταξύ των ομάδων Control & YAE στις ίδιες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές *p < 0.05 ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

Παρατηρήσεις:

↳ Ιστός Τετρακεφάλου

TAC(mmol DPPH/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	0.530 ± 0.030	0.767 ± 0.022	0.870 ± 0.067

Πίνακας 20: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας , στον ιστό του τετρακεφάλου για τις ομάδες Control.

TAC(mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	0.729 ± 0.036	0.918 ± 0.066

Πίνακας 21: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, στον ιστό του τετρακέφαλου για τις πολυφαινολικές ομάδες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή της TAC από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

TAC(mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
Control	0.767 ± 0.022	0.870 ± 0.067
Πολυφαινολικά	0.729 ± 0.036	0.918 ± 0.066

Πίνακας 22: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, στον ιστό του τετρακεφάλου για τα Control και τα πολυφαινολικά ζώα.

↳ Ιστός Εγκεφάλου

TAC(mmol DPPH/mg protein)	**15 ημέρες**	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
M.O. ± SEM	0.572 ± 0.070	0.381 ± 0.018	0.328 ± 0.039

Πίνακας 23: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας , στον ιστό του εγκεφάλου για τις ομάδες Control.

TAC(mmol DPPH/mg protein)	**42 ημέρες**	**70 ημέρες**
M.O. ± SEM	0.595 ± 0.052	0.435 ± 0.015

Πίνακας 24: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, στον ιστό του τετρακεφάλου για τις πολυφαινολικές ομάδες.

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες υπάρχει **στατιστικά σημαντική** αύξηση κατά 56% της TAC από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

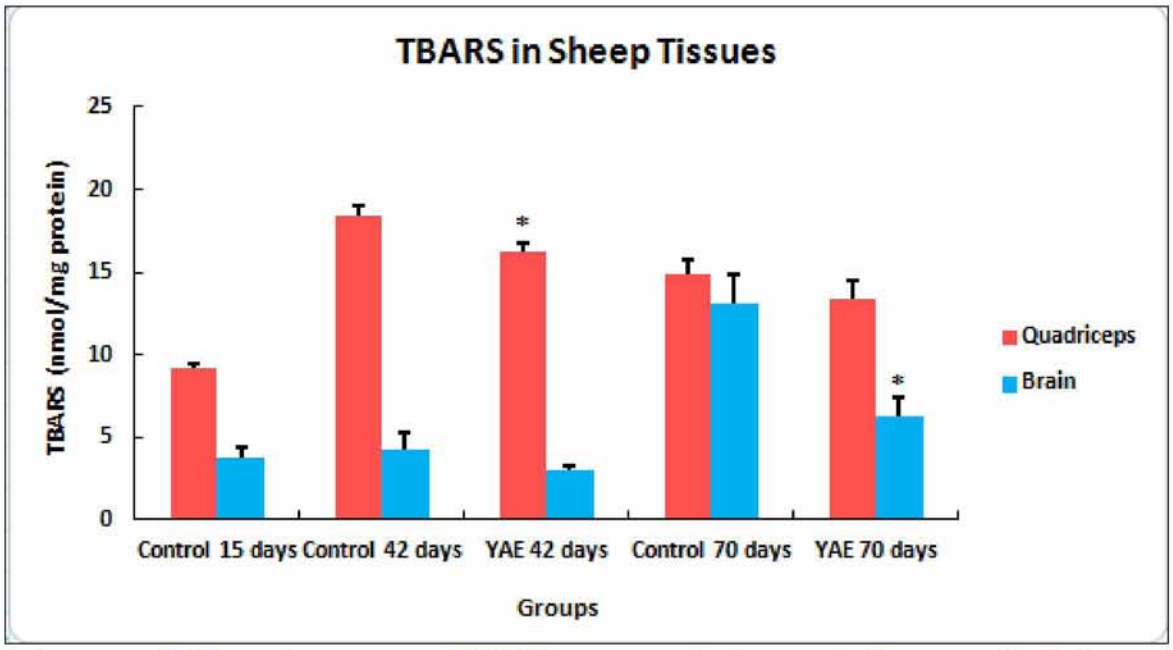
Στις 70 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** αύξηση κατά 32.6% της TAC από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

TAC(mmol DPPH/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	0.381 ± 0.018	0.328 ± 0.039
Πολυφαινολικά	0.595 ± 0.052	0.435 ± 0.015

Πίνακας 25: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, στον ιστό του τετρακεφάλου για τα Control και τα πολυφαινολικά ζώα.

4.2.4 Αποτελέσματα TBARS



Διάγραμμα 5: Η συγκέντρωση των TBARS στους ιστούς (τετρακέφαλο και εγκέφαλο), μεταξύ των ομάδων Control & YAE στις ίδιες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές *p < 0.05 ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Παρατηρήσεις:

↳ Ιστός Τετρακεφάλου

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	9.215 ± 0.287	18.469 ± 0.621	14.854 ± 0,960

Πίνακας 26: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του τετρακεφάλου για τις ομάδες Control.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	16.279 ± 0,556	13.358 ± 1.108

Πίνακας 27: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του τετρακεφάλου στις πολυφαινολικές ομάδες.

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες υπάρχει **στατιστικά σημαντική** μείωση κατά 11.8% των TBARS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Στις 70 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	18.469 ± 0.621	14.854 ± 0,960
Πολυφαινολικά	16.279 ± 0,556	13.358 ± 1.108

Πίνακας 28: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του τετρακεφάλου στα Control και στα πολυφαινολικά ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

↳ Ιστός Εγκεφάλου

TBARS (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	3.725 ± 0.613	4.283 ± 1.055	13.098 ± 1.780

Πίνακας 29: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του εγκεφάλου για τις ομάδες Control.

TBARS (nmol/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	3.054 ± 0.259	6.284 ± 1.104

Πίνακας 30: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του εγκεφάλου στις πολυφαινολικές ομάδες.

➤ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των TBARS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

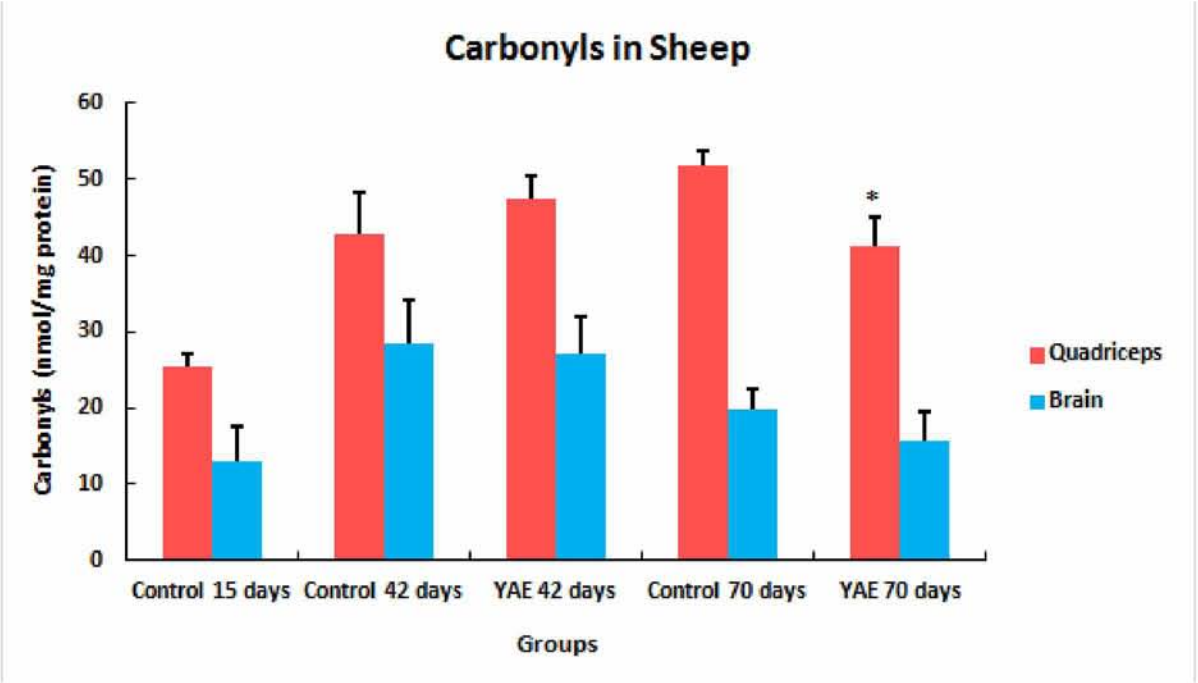
Στις 70 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** μείωση κατά 52% των TBARS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	4.283 ± 1.055	13.098 ± 1.780
Πολυφαινολικά	3.054 ± 0.259	6.284 ± 1.104

Πίνακας 31: Επίπεδα TBARS, για τον ιστό του εγκεφάλου στα Control και στα πολυφαινολικά ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4.2.5 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα 6: Τα συνολικά επίπεδα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών στους ιστούς (τετρακέφαλο και εγκέφαλο), μεταξύ των ομάδων Control & YAE στις ίδιες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές τιμές *p < 0.05 ορίζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές Control κάθε ομάδας την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας.

Παρατηρήσεις:

↳ Ιστός Τετρακεφάλου

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	25.486 ± 1.497	42.736 ± 5.552	51.931 ± 1.764

Πίνακας 32: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του τετρακεφάλου για τις ομάδες Control.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	47.530 ± 2.884	41.214 ± 3.746

Πίνακας 33: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του τετρακεφάλου στις πολυφαινολικές ομάδες.

➢ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 ημέρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των CARBS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

Στις 70 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική** μείωση κατά 20.6% των CARBS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	42.736 ± 5.552	51.931 ± 1.764
Πολυφαινολικά	47.530 ± 2.884	41.214 ± 3.746

Πίνακας 34: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του τετρακεφάλου στα Control και πολυφαινολικά ζώα.

↳ Ιστός Εγκεφάλου

CARB (nmol/mg protein)	15 ημέρες	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	12.972 ± 4.764	28.406 ± 5.746	19.678 ± 2.687

Πίνακας 35: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του εγκεφάλου για τις ομάδες Control.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

CARB (nmol/mg protein)	42 ημέρες	70 ημέρες
M.O. ± SEM	27.006 ± 4.928	15.642 ± 3.749

Πίνακας 36: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του εγκεφάλου στις πολυφαινολικές ομάδες.

➢ Σύγκριση των ομάδων Control με τις πολυφαινολικές ομάδες

Στις 42 και στις 70 ημέρες δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των CARBS από τα Control στα πολυφαινολικά ζώα.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	42 ημέρες	70 ημέρες
Control	28.406 ± 5.746	19.678 ± 2.687
Πολυφαινολικά	27.006 ± 4.928	15.642 ± 3.749

Πίνακας 37: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, για τον ιστό του εγκεφάλου στα Control και πολυφαινολικά ζώα.

5. Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών προβάτων κρεατοπαραγωγής, Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», τα οποία, ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν, εκτρέφονταν με διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα που αποτελούσε την ομάδα Control, τρέφονταν με το βασικό σιτηρέσιο ενώ η δεύτερη ομάδα με σιτηρέσιο το οποίο περιελάμβανε πολυφαινολικά πρόσθετα από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου.

Συνολικά είκοσι οχτώ (28) πρόβατα χρησιμοποιήθηκαν στα οποία έγιναν τρείς (3) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, και πιο συγκεκριμένα στις δέκα πέντε (15), σαράντα δύο (42) και εβδομήντα (70) ημέρες από τη γέννησή τους. Μέχρι και τις δέκα πέντε (15) ημέρες από τη γέννηση τους, τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα, η τροφή τους εκτός από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα μέχρι και την εβδομηκοστή (70) ημέρα από τη γέννηση τους, όπου τα πρόβατα λάμβαναν αποκλειστικά το πειραματικό σιτηρέσιο.

Για να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των νεαρών προβάτων πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών του οξειδωτικού στρες τόσο στον ιστό του τετρακέφαλου μυ όσο και στον ιστό του εγκεφάλου, μετά την χορήγηση ζωοτροφής ενισχυμένη με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που ελέγχθηκαν, για τον εγκεφαλικό και τετρακέφαλο ιστό των νεαρών προβάτων, ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (Protein Carbonyls). Παράλληλα, διεξήχθη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή τόσο του βασικού σιτηρέσιου της ομάδας Control όσο και του σιτηρέσιου της ομάδας που ήταν εμπλουτισμένο με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Γι' αυτό το λόγο, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, προσδιορίστηκε η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες ABTS και DPPH. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν τόσο για τη ρίζα του DPPH, όσο και για τη ρίζα του ABTS, ήταν ότι η ζωοτροφή με YAE παρουσίαζε σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου. Κατά συνέπεια, με βάση τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, μας δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των προβάτων σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και της πολυφαινολικής ομάδας κατά τη διάρκεια των διαφορετικών δειγματοληπτικών στιγμών.

Η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών και ενεργών μορφών του οξυγόνου ενώ συντηρεί και προσλαμβανόμενα από τη διατροφή αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et.al.) (HUGHES, 1964). Επίσης ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Ha et al., 1999) και τέλος είναι υπεύθυνη για την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δύο πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ και η ελευρωπαΐνη, αυξάνουν την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

έκφραση και τη δραστικότητα του ενζύμου της υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και συνεπώς ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της άμεσης απομάκρυνσης των ROS. Με αυτό τον τρόπο συνεισφέρουν στη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης. (Gerasopoulos et al., 2015). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία στον ιστό του εγκεφάλου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH στις 42 και στις 70 ημέρες στις πολυφαινολικές ομάδες σε σχέση με τις ομάδες Control, υποδεικνύοντας αυξημένη αντιοξειδωτική άμυνα του ζώου και πιθανή ευεργετική δράση των πολυφαινολών της εμπλουτισμένης ζωοτροφής. Στον ιστό του τετρακέφαλου μυ παρατηρήθηκε και εδώ μία στατιστικά σημαντική αύξηση της δράσης της GSH της τάξης του 40.8% στις 70 ημέρες μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με υποπροϊόντα υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (Y.A.E.) τα οποία αποτέλεσαν μέρος του σιτηρεσίου για τη δεύτερη ομάδα (πολυφαινολική), συνεπώς παρουσιάζουν θετικό αποτέλεσμα καθώς η αύξηση στην τιμή της GSH συνεπάγεται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Ο επόμενος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η καταλάση (CAT). Στον εγκέφαλο η δραστικότητα της καταλάσης παρουσιάζει διακυμάνσεις λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του ενζύμου (<10min). Όσον αφορά τις μετρήσεις μας για τη δραστικότητα της καταλάσης, παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντική αύξηση της καταλάσης στον ιστό του τετρακέφαλου μυ του επιπέδου του 116% στις 70 ημέρες στα πολυφαινολικά ζώα σε σχέση με τα Control. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι ζωοτροφή που περιέχει υποπροϊόντα Y.A.E βοηθάει τη δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης με συνέπεια την αύξηση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε H_2O και O_2. Παρεμφερή αποτελέσματα είχε και έρευνα που πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση πολυφαινολών σε κοτόπουλα που είχε ως αποτέλεσμα, η CAT να παρουσιάσει σημαντική αύξηση στις πολυφαινολικές σε σχέση με τις control ομάδες (Gerasopoulos, Stagos, Kokkas, et al., 2015). Αντίθετα στον ιστό του εγκεφάλου δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές μεταβολές. Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε (Goutzourelas et.al., 2015), φάνηκε ότι στον τετρακέφαλο ιστό η χορήγηση εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (GPE), δεν ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και HO-1 ένζυμα. Σε αυτή τη μελέτη, η θεραπεία με GPE στα μυϊκά κύτταρα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα.

Ακολούθως μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο κάθε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά και ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο, όπως πραγματοποιήθηκε και στην παρούσα πτυχιακή μελέτη. Σύμφωνα με τις μετρήσεις μας παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC στον εγκεφαλικό ιστό, τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες, της τάξης του 56% και 32.6% αντίστοιχα ανάμεσα στις πολυφαινολικές ομάδες και τις ομάδες Control. Αντίθετα, για τον τετρακέφαλο ιστό δεν σημειώθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή ούτε στις 42 και 70 ημέρες. Η GSH αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στις 70 ημέρες ωστόσο η TAC δεν αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά, καθώς η αύξηση της GSH μπορεί να λειτουργεί σαν αντιστάθμισμα της μείωσης άλλων αντιοξειδωτικών μορίων. Σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κοτόπουλα που λάμβαναν ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υποπροϊόντα αποβλήτων ελαιοτριβείου βρέθηκε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ήταν αυξημένη και μάλιστα μεγαλύτερη για τις πολυφαινολικές ομάδες (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015).

Στην συνέχεια μετρήθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων (TBARS) στους δυο ιστούς. Η υπεροξείδωση λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροστάνια) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Τα υψηλά επίπεδα των ROS στον εγκέφαλο έχουν σαν αποτέλεσμα την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης, την αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των θειοβαρβιτουρικών δραστικών ουσιών (TBARS) (Anna Karin Welin,2004). Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα σημειώθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS στον ιστό του τετρακέφαλου μυ στις 42 ημέρες, ενώ στον ιστό του εγκεφάλου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στις 70 ημέρες συγκρίνοντας τις ομάδες Control με τις πολυφαινολικές ομάδες την ίδια χρονική στιγμή. Η μείωση των TBARS αποδεικνύει ότι οι πολυφαινόλες συμβάλουν στην μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015) με συνέπεια την καλύτερη επίδραση στην υγεία του ζώου και τη βελτίωση της ποιότητας του κρέατος (Arshad et al., 2013). Η υπεροξειδίωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας τους κρέατος, καθώς και στην παραγωγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

διάφορων τοξικών ενώσεων (Rey et al., 2001). Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας, στην οποία έγινε χορήγηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (YAE) σε χοίρους, μειώθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων σε όλους τους ιστούς και το αίμα (Gerasopoulos, Stagos, Petrotos, et al., 2015), γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών που βρίσκονται στα YAE.

Τέλος, η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση διαφόρων αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στον ιστό του τετρακέφαλου μυ παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των CARBS στην πολυφαινολική ομάδα στις 70 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στο ιστό του εγκεφάλου, τόσο στις 42 όσο και στις 70 ημέρες, η σχέση ανάμεσα σε Control και πολυφαινολική ομάδα δεν παρουσιάζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Συνεπώς, καθώς υπάρχει μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώνεται η οξείδωση των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό πρωτεϊνών και συσσωμάτωση, επηρεάζοντας έτσι την πεπτικότητα τους, η οποία μειώνει τη θρεπτική αξία των τροφών (Chen et al., 2013). Σε άλλες πρόσφατες μελέτες, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαν και εκεί αυξημένες τιμές στις ομάδες Control σε σχέση με τις πολυφαινολικές, ενώ με το πέρας των ημερών παρουσιάστηκε συνεχής μείωση στις πολυφαινολικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι πολυφαινόλες αποτρέπουν την οξείδωση των πρωτεϊνών (Gerasopoulos et al., 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση τόσο της οξείδωσης των λιπιδίων (TBARS) όσο και της οξείδωσης των πρωτεϊνών (CARB) που παρατηρήθηκε στον ιστό του τετρακεφάλου, αποτελεί σημαντικό αποτέλεσμα, αφού είναι ένας ιστός συχνής κατανάλωσης από τον άνθρωπο. Συνεπώς είναι αξιοσημείωτα τα αποτελέσματα και για τους καταναλωτές.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στην άποψη των ευεργετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν οι ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου. Αρχικά, παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση ενισχύοντας την άμυνα των προβάτων έναντι των οξειδωτικών παραγόντων και στη συνέχεια θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα, θρεπτική αξία του κρέατος. Τέλος είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς παρουσιάζει και περιβαλλοντικό ενδιαφέρον με την αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων οδηγώντας στην μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105, 121–126.
- Agarwal C., Sharma Y. and Agarwal R., (2000), *Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signalling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis, Mol. Carcinogen.* 28: 129–138.
- Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N.,Kouretas, D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *61*, 60–68. http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.029
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V, Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research*. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, *5*, 196. http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196
- Arshad, M. S., Anjum, F. M., Khan, M. I., Shahid, M., Akhtar, S., & Sohaib, M. (2013). Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 164. http://doi.org/10.1186/1476-511X-12-164
- Baliga, M. S., Haniadka, R., Pereira, M. M., D'Souza, J. J., Pallaty, P. L., Bhat, H. P., & Popuri, S. (2011). Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(6), 499–523. http://doi.org/10.1080/10408391003698669
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *55*(1), 1–23. http://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7
- BEERS, R. F. J., & SIZER, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, *195*(1), 133–140.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., & Visioli, F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, *190*(1), 181–186. http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.011
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants-Double-edged swords in

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *3*(4), 228–237. http://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858

- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J. P., & Seve, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, *134*(9), 2256–2262.
- BradfordM.M 1976 Arapid sensitive method for the quantification of microgram of protein util izingthe principle of protein- DyeBinding. AnalBiochem 72:248-254.
- Camire, M. (2002). *Phytochemicals in the Vaccinium family: bilberries, blueberries, and cranberries*. *Phytochemicals in nutrition and health*. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cJHsMALUDj0C&oi=fnd&pg=PA19&dq=phytochemicals+and+diabetes&ots=gJWBqxpTyh&sig=TGxwoUqe9ftiFUpcPb1WlMVeEE4
- Castaner, O., Fito, M., Lopez-Sabater, M. C., Poulsen, H. E., Nyyssonen, K., Schroder, H., … Covas, M.-I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *30*(4), 490–493. http://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.01.013
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*(3), 481–493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *61*(2), 192–208. http://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5
- Chen, Y. P., Chen, X., Zhang, H., & Zhou, Y. M. (2013). Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. *British Poultry Science*, *54*(4), 531–537. http://doi.org/10.1080/00071668.2013.809402
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(3), 218–236. http://doi.org/10.1080/10408390701856223
- Michael N Clifford, 15 May 2000, Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(10), 1195–1214. http://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev
- Covas, M.-I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., … Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *145*(5), 333–341.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342. http://doi.org/10.3390/ijms11041321

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, *65*(4), 337–353.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, *59*(4), 459–469.
- Elizabeth M. Boon, Aaron Downs, David Marcey, David Marcey, 2001, Catalase: H2O2 Oxidoreductase
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, *411*(6835), 342–348. http://doi.org/10.1038/35077213
- Fito, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Marti, J., Alcantara, M., Pujadas-Bastardes, M., … Covas, M. I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*. http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.036
- Frankel, E., Bakhouche, A., Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(22), 5179–5188. http://doi.org/10.1021/jf400806z
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.021 *Food and Chemical Toxicology*, *82*, 42–49.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., Kokkas, S., Kantas, D., Goulas, P., & Kouretas, D. (2015). Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.007 *Food and Chemical Toxicology*, *86*, 319–327.
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., … Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention-Organisation-(ECP)*,*22*(1),90–95. http://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7
- Daniel l. Gilbert, January 2000, Fifty Years of Radical Ideas
- Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative-stress. http://doi.org/10.1515/BC.2002.042 *Biological-Chemistry.383*(3-4),375–388.
- Gordon, T., Kannel, W. B., Castelli, W. P., & Dawber, T. R. (1981). Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Archives of Internal Medicine*, *141*(9), 1128–1131.
- Guiso, M., & Marra, C. (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural* http://doi.org/10.1080/14786410410001696147
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*(12 Pt 2), 1819–1828.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., … Cobbett, C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast Schizosaccharomyces pombe. *The Plant Cell*, *11*(6), 1153–1164.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, *18*(9), 685–716.
- Halliwell B., Gutteridge J., 1999, Journal Article, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1–85.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, *8*(9), 950–988. http://doi.org/10.3390/i8090950
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(26), 9966–9977. http://doi.org/10.1021/jf061478a
- Hart, J. H., & Hillis, W. E. (1974). Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in Eucalyptus sideroxylon. *Phytopathology*. http://doi.org/10.1094/Phyto-64-939
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., … Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, *155*(4), 381–386.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *58*(11-12), 879–884.
- Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J., & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against Campylobacter jejuni. *Infection and Immunity*, *76*(3), 986–993. http://doi.org/10.1128/IAI.01063-07
- Jain, A., & Flora, S. J. S. (2012). Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, *33*(2), 233–238.
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *62*(3), 231–236.
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisymeon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, *128*, 749–758. http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.027
- Kataria, A.K., Kataria, N., 2012b. *Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever*. Porc Res. 2(2), pp.35-38.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- Kataria A. K.Kataria N., Journal of Stress Physiology & Biochemistry, № 4 / том 8 / 2012, *Evaluation of oxidative stress in sheep affected with peste des petits ruminants*
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *28*(2), 141–143.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., … Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *12*(1), 67–75. http://doi.org/10.1097/01.cej.0000051106.40692.d3
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 540S–542S.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., … Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, *113 Suppl* , 71S–88S.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V, … Gansler, T. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *62*(1), 30–67. http://doi.org/10.3322/caac.20140
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., & Amendola, V. (2006). *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*. *Phytochemistry* (Vol. 661).
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(1), 83–95. http://doi.org/10.1002/mnfr.201000453
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *173*(3), 502–511. http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005
- Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). HumanBiologyandHealth. EnglewoodCliffs, NewJersey, USA: PrenticeHall.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747.
- Medina, E., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(14),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

4954–4961. http://doi.org/10.1021/jf0602267

- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, *81*(1), 326S–329. Retrieved from http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/81/1/326S
- Mark S Meskin, Wayne R Bidlack, Audra J Davies, and Stanley T Omaye, 2002, Phytochemicals in Nutrition and Health
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska, E., & Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, *76*(9), 2812–2823. http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Science*, *63*(1), 1–8.
- Nicolaiew, N., Lemort, N., Adorni, L., Berra, B., Montorfano, G., Rapelli, S., … Jacotot, B. (1998). Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *42*(5), 251–260.
- Athina Papadopoulou, Richard A. Frazier, *Characterization of protein–polyphenol interactionsTrends in Food Science & Technology*, Volume 15, Issues 3–4, March–April 2004, Pages 186–190.
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, *29*(2), 351–378. http://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *333*(1), 19–39.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. *Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure*, 2004.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative
- stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55–74. http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2011*. http://doi.org/10.1155/2011/194586
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *50*(3), 586–621. http://doi.org/10.1002/anie.201000044
- Ramirez-Tortosa, C., Lopez-Pedrosa, J. M., Suarez, A., Ros, E., Mataix, J., & Gil, A.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

(1999). Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *The British Journal of Nutrition*, *82*(1), 31–39.

- Reinisch, N., Kiechl, S., Mayr, C., Schratzberger, P., Dunzendorfer, S., Kahler, C. M., … Wiedermann, C. J. (1998). Association of high plasma antioxidant capacity with new lesion formation in carotid atherosclerosis: a prospective study. *European Journal of Clinical Investigation*, *28*(10), 787–792.
- Rey, A. I., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Lopez-Bote, C. J., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of Animal Science*, *79*(5), 1201–1208.
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *15*(4), 304–317.
- Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., … Palli, D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *The British Journal of Nutrition*, *95*(4), 742–751.
- Reddy, Y N, Murthy, S V, Krishna, D R, Prabhakar, M C, "*Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients*", Indian Journal of Tuberculosis. 2004 Oct; 51(4): 213-218.
- R. W. SCHOLZ, K. S. GRAHAM,E. GUMPRICHT,C. C. REDDY, December 1989, Mechanism of Interaction of Vitamin E and Glutathione in the Protection against Membrane Lipid Peroxidation.
- Schwartz, G. G. (2014). Vitamin D in blood and risk of prostate cancer: lessons from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial and the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *23*(8), 1447–1449. http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0520
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *5*(3), 237–245.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, *91*(3C), 31S–38S.
- Silage fermentation processes and their manipulation - Stefanie J.W.H. Oude Elferink, Frank Driehuis, Jan C. Gottschal, and Sierk F. Spoelstra, 2008
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, *30*(2), 91–113.
- Takako Yokozawa,Eun Ju Cho, Chan Hum Park, and Ji Hyun Kim, *Protective Effect of Proanthocyanidin against Diabetic Oxidative Stress, Institute of Natural Medicine*, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan 2Department of Food Science and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea, (Received 28 April 2011; Revised 1 June 2011; Accepted 9 June 2011).

- Tomoaki Ikeda,Ben H Choi, Simon Yee,Yuji Murata,Edward J Quilligan, *Oxidative stress, brain white matter damage andintrauterine asphyxia in fetal lambs*, International Journal of Developmental Neuroscience,1999.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. http://doi.org/10.3390/nu2121231
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84. http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*(1), 1–40. http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Villaverde, A., Morcuende, D., & Estevez, M. (2014). Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of Food Science*, *79*(7), C1331–42. http://doi.org/10.1111/1750-3841.12481
- Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *247*(1), 60–64. http://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., … Galli, C. (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, *44*(2), 121–127. http://doi.org/10.1007/s00394-004-0504-0
- Wang, Z.-H., Gao, Q.-Y., & Fang, J.-Y. (2012). Green tea and incidence of colorectal cancer: evidence from prospective cohort studies. *Nutrition and Cancer*, *64*(8), 1143–1152. http://doi.org/10.1080/01635581.2012.718031
- Wayne R. Bidlack, Stanley T. Omaye, Mark S. Meskin, Debra K.W. Topham, March 16, 2000, "Phytochemicals as Bioactive Agents"
- Weinbrenner, T., Fito, M., de la Torre, R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., … Covas, M.-I. (2004). Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of Nutrition*, *134*(9), 2314–2321.
- Weisburger, J. H. (2001). Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *226*(10), 891–897.
- Weiss, W. P., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (2004). Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. *Journal of Dairy Science*, *87*(1), 32–37. http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73138-0

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

- Anna-Karin Welin, Mats Sandberg, Anna Lindblom, Pernilla Arvidsson, Ulf A Nilsson, Ingemar Kjellmer and Carina Mallard, White Matter Injury Following Prolonged Free Radical Formation in the 0.65 Gestation Fetal Sheep Brain,2005.
- Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England)*, *344*(8925), 793–795.
- World Cancer Research Fund, & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.Cancer Research*.
- Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., … Imai, K. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*, *83*(1), 35–44. http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.002
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, *26*(3), 151–194.
- Σημειώσεις βιοχημικής τοξικολογίας, Κουρέτας Δ. (Καθηγητής)
- Σμοκοβίτη Αθ., Φυσιολογία, έκδοση 2007
- Μήτσιος Δημήτριος (2014), «*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ιστούς (νεφρικός – πνευμονικός - τετρακέφαλος) από νεαρά χοιρίδια κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής με πολυφαινολικά πρόσθετα*» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα.
- Καραβέλη Χριστίνα (2014), «*σε ιστούς (καρδιακός - νεφρικός – πνευμονικός – μυϊκός) από νεαρά χοιρίδια κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής με πολυφαινολικά πρόσθετα*» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα.
- Τερζοπούλου Ζωή (2015), «*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε εγκεφαλικό και μυϊκό (τετρακέφαλο) ιστό, νεαρών προβάτων κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής με πολυφαινολικά πρόσθετα*» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα..
- Κούκα Ν. Παρασκευή (2015) «*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ιστούς (καρδιά - ήπαρ) από νεαρά πρόβατα κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής με πολυφαινολικά πρόσθετα*». Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα.
- Χατζής Αλέξανδρος (2015) «*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες (τετρακέφαλος-καρδιά) και αίμα από νεαρά χοιρίδια κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής με στέμφυλα*». Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα.
- Σάββα Σαλώμη (2016) «*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ιστούς (ήπαρ και σπλήνα) από νεαρά πρόβατα κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου*». Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
25/04/2024 04:42:59 EEST - 18.191.174.168