

**“ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΣΟΛΟΜΩΝ ΠΟΥ ΤΟΥΣ ΕΧΕΙ ΧΟΡΗΓΗΘΕΙ
ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗ ΜΕ ΥΠΟΠΡΟΙΟΝΤΑ
ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ”**



**“EVALUATION OF REDOX STATUS IN TISSUES OF SALMON
AFTER THE ADMINISTRATION OF FOOD ENRICHED WITH
OLIVE OIL MILL WASTEWATER BIOACTIVE COMPOUNDS”**

Σκοπελίτη Αναστασία του Ανάργυρου

Λάρισα 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με γνωστικό αντικείμενο «Φυσιολογία Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογία»

Ταϊτζόγλου Ιωάννης: Καθηγητής στο Τμήμα της Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με γνωστικό αντικείμενο «Φυσιολογία των Ζώων»

Βεσκούκης Αριστείδης: Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με γνωστικό αντικείμενο «Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στον Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, ο οποίος, ως επιβλέπων της συγκεκριμένης εργασίας, μού έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα υψηλού επιστημονικού και συνάμα εμπορικού ενδιαφέροντος.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ταϊτζόγλου Ιωάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αριστεΐδη Βεσκούκη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή.

Για το τέλος άφησα όλα τα μέλη του εργαστηρίου, με τα οποία συνεργάστηκα για τέσσερις περίπου μήνες. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Συμβασιούχο Διδάσκοντα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Σκαπέρδα Ζωή για την πολύτιμη βοήθειά της και τις συμβουλές που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ, ακόμα, τη Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Μακρή Σωτηρία για την υπομονή και τη διάθεση της να με μνήσει σε βασικές πειραματικές διαδικασίες, που πραγματοποιούνται εντός του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Τέλος, ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τα οποία αν και δεν αναφέρω ονομαστικά, ήταν πάντα πρόθυμα να παράσχουν την οποιαδήποτε βοήθεια ζήτησα, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην δημιουργία ενός φιλικού κλίματος έως και την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	8
1.2 Δημιουργία ελευθέρων ριζών (ROS)	9
1.3 Θετικές και Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	10
1.4 Οξειδωτικό στρες.....	11
1.5 Αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα	11
1.6 Το ελαιόλαδο	14
1.6.1 Σημασία ελαιόλαδου στη διατροφή.....	16
1.6.2 Ελαιοτρίβηση.....	16
1.6.3 Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων	17
1.6.4 Φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων	18
1.6.5 Παραπροϊόντα ελαιοτρίβησης	19
1.7 Ο σολομός	20
2 ΣΤΟΧΟΣ	21
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
3.1 Δείγματα.....	22
3.2 Επεξεργασία δειγμάτων αίματος	22
3.3 Προσδιορισμός Αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin-Hb).....	23
3.4 Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)	24
3.5 Προσδιορισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)	25
3.6 Προσδιορισμός TBARS.....	27
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
4.1 Υπολογισμός Αιμοσφαιρίνης.....	28
4.2 Υπολογισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)	29
4.3 Υπολογισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC).....	31
4.4 Υπολογισμός TBARS.....	33
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39
7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1.1: Μορφές ROS	8
Εικόνα 1.2.1: Εξωγενείς πηγές δημιουργίας ελευθέρων ριζών.....	9
Εικόνα 1.2.2: Ραδιόλυση νερού	10
Εικόνα 1.4.1: Δημιουργία οξειδωτικού στρες.....	11
Εικόνα 1.5.1: Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών μέσω της δράσης του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος	12
Εικόνα 1.5.2: Η αντίδραση που καταλύεται από τη SOD	12
Εικόνα 1.5.3: Η αντίδραση που καταλύεται από την καταλάση	12
Εικόνα 1.5.4: Η αντίδραση που καταλύεται από την GSH-PX	13
Εικόνα 1.5.5: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης	13
Εικόνα 1.6.1: Κατανομή παραγωγής ελαιόλαδου παγκοσμίως.....	14
Εικόνα 1.6.2: Δομή Τριγλυκεριδίου	15
Εικόνα 1.6.3: Περιεκτικότητα ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα.....	15
Εικόνα 1.6.2.1: Διάγραμμα ροής φυγοκεντρικού ελαιοτριβείου.....	16
Εικόνα 1.6.3.1: Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων.....	17
Εικόνα 1.7.1: Διατροφική αξία σολομού. United States Department of Agriculture (USDA)	20
Εικόνα 3.2.1: Διαχωρισμός πλάσματος και ερυθροκυττάρων μέσω φυγοκέντρωσης.....	22
Εικόνα 3.4.1: Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης	24
Εικόνα 4.2.1: Επίδραση στον δείκτη οξειδωτικού στρες GSH σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου. (*** υποδηλώνει $p < 0.001$)	30
Εικόνα 4.3.1: Επιδράσεις στον δείκτη οξειδωτικού στρες TAC σε πλάσμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου, (* υποδηλώνει $p < 0.05$).	32
Εικόνα 4.4.1: Επιδράσεις στον δείκτη των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS σε πλάσμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου.....	34

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ελαιόλαδου. Αποτελούνται τόσο από το νερό που χρησιμοποιείται για την πλύση του καρπού όσο και από τα υγρά του ίδιου του καρπού, ενώ είναι πλούσια σε οργανικό φορτίο, με τις φαινόλες να συνιστούν το μεγαλύτερο ποσοστό αυτού. Η υψηλή περιεκτικότητα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σε φαινόλες είναι υπεύθυνη για την τοξικότητά τους, καθιστώντας τα με αυτόν τον τρόπο σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η ανάπτυξη διφασικών ελαιοτριβείων, στα οποία, μέσω κατάλληλων μεθόδων, γίνεται προσπάθεια αξιοποίησης των υγρών αποβλήτων, με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος. Στο πλαίσιο αυτής της αξιοποίησης, έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα η παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών, βάσει των οποίων αποτελούν τα χρήσιμα συστατικά των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος σολομών. Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου, οι οποίες χορηγήθηκαν σε σολομούς για έξι εβδομάδες μετά τη γέννησή τους. Στο τέλος της έκτης εβδομάδας πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος, με στόχο την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής του κατάστασης, μέσω κατάλληλων βιοδεικτών, όπως αυτών της αιμοσφαιρίνης, της ανηγμένης γλουταθειόνης, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSH, αλλά και της TAC, καθώς επίσης και μια μικρή ελάττωση στα επίπεδα των TBARS των πειραματικών ομάδων, η οποία ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Γίνεται αντιληπτό ότι τα παραπροϊόντα της παραγωγής ελαιόλαδου μπορούν να χρησιμεύσουν για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενισχύσουν γενικότερα την αντιοξειδωτική ικανότητα των οργανισμών που τις καταναλώνουν.

ABSTRACT

Olive mill liquid waste (OLW) is a result of olive oil production. They consist of both the water used to wash the fruit and the liquids of the fruit itself, while they are rich in organic load, with phenols constituting the largest percentage of this. The high phenolic content of olive mill wastewater is responsible for its toxicity, thus making it an important environmental pollutant.

In recent years, the development of two-phase oil mills has been observed, in which, through appropriate techniques, an attempt is made to utilize liquid waste, with the aim of protecting the environment. In the context of this utilization, the production of biofunctional feed has been particularly developed, based on the useful components of the liquid waste of olive mills.

The purpose of this thesis was to assess the effect of olive mill wastewater on the redox state of salmon blood. For this reason, feeds enriched with biphasic mill effluent were created and fed to salmon six weeks after birth. At the end of the sixth week, blood was drawn, with the aim of assessing its redox status, through appropriate biomarkers, such as hemoglobin, reduced glutathione, catalase, total antioxidant capacity (TAC) and substances that react with thiobarbituric acid (TBARS).

The results showed a statistically significant increase in the levels of GSH and TAC, as well as a slight non-significant decrease in the levels of TBARS of the experimental groups, compared to the control groups. Noticeably the by-products of oil-pressing can be used to create biofunctional food rich in antioxidants, which in turn will generally advance the antioxidant capacity of the organisms that consume them.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ο όρος «ελεύθερη ρίζα» αναφέρεται σε ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Πρόκειται για μικρά, βραχύβια και ασταθή μόρια, τα οποία μπορεί να είναι ηλεκτρικά ουδέτερα ή φορτισμένα, είτε θετικά είτε αρνητικά. Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζουν μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να έχουν την ικανότητα να επιτίθενται σε άτομα που περιέχουν θέσεις αυξημένης πυκνότητας ηλεκτρονίων, με στόχο την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου και κατ' επέκταση τη δημιουργία νέου ζεύγους ηλεκτρονίων (Sengupta A. et al., 2004). Η δράση τους αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ελευθέρων ριζών, η συσσώρευση των οποίων προκαλεί πληθώρα προβλημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό (Mylonas et al., 1999).

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες ελευθέρων ριζών, με πιο χαρακτηριστικές τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο (O_2). Η παραγωγή τους είναι, κυρίως, το αποτέλεσμα της εξασθενημένης λειτουργίας του μηχανισμού μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων της αερόβιας αναπνοής (Παπαγαλάνης N, 2014). Διακρίνονται διάφορες μορφές ROS, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου (peroxide, $\cdot O_2^{-2}$), οι ρίζες σουπεροξειδίου (superoxide, $\cdot O_2^{-}$), οι ρίζες υδροξυλίου (hydroxyl radical, $\cdot OH$), κτλ (Veskoukis et al., 2012) (Εικόνα 1.1.1).



Εικόνα 1.1.1: Μορφές ROS

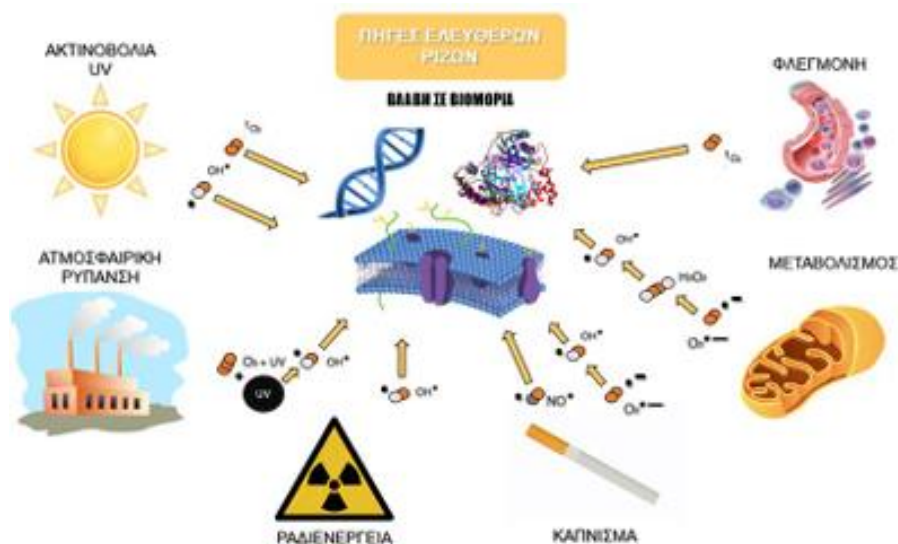
Όσον αφορά στις δραστικές μορφές αζώτου, η προέλευσή τους είναι αποτέλεσμα της δράσης των ενζύμων NO-συνθάση και NADPH οξειδάση, τα οποία παράγουν νιτρικό οξείδιο ($NO\cdot$) και το υπεροξειδίο ($\cdot O_2^{-}$) αντίστοιχα. Οι RNS παράγονται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Στα φυτά, παράγονται ως απόκριση στο

στρες ή ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού. Στα ζώα, οι δραστικές μορφές αζώτου παράγονται κατά την αντίδραση των $\text{NO}\cdot$ και $\cdot\text{O}_2^-$ προς σχηματισμού του περοξυνιτρικού (ONOO^-). Το ONOO^- έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια, οδηγώντας στη δημιουργία νέων RNS ή ακόμα και με πρωτεΐνες που σχηματίζουν δεσμούς με μέταλλα, όπως η αιμοσφαιρίνη, τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τη δομή και κατά συνέπεια τη λειτουργία τους (Παπαγαλάνης Ν, 2014, Cuzzocrea S et al, 2001).

1.2 Δημιουργία ελευθέρων ριζών (ROS)

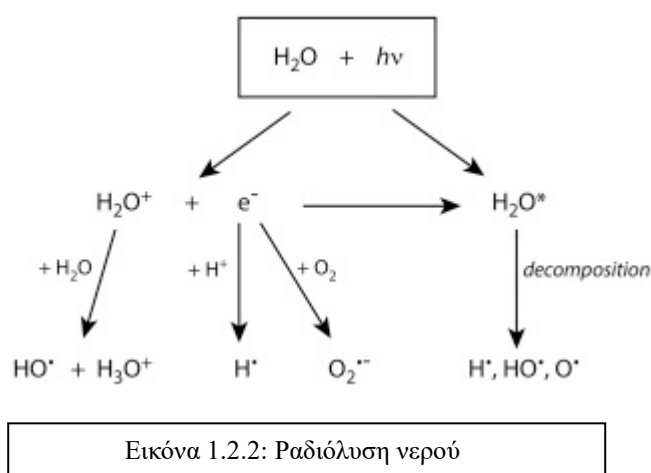
Η δημιουργία των ελευθέρων ριζών είναι αποτέλεσμα τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών πηγών. Η ενδογενής παραγωγή οφείλεται κυρίως στη δράση ενζύμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ένζυμα, όπως η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή του κυτοχρώματος, που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τη μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών που παράγονται σε έναν οργανισμό (Di Meo and Venditti 2001)).

Στην περίπτωση των εξωγενών πηγών, υπεύθυνη για το σχηματισμό ελευθέρων ριζών είναι μια ποικιλία παραγόντων, όπως η ρύπανση του αέρα και του νερού, ο καπνός, η διατροφή, το αλκοόλ, τα βαρέα μέταλλα, τα φάρμακα, η ακτινοβολία κτλ.



Εικόνα 1.2.1: Εξωγενείς πηγές δημιουργίας ελευθέρων ριζών

Από τους παραπάνω εξωγενείς παράγοντες, ιδιαίτερα επιβλαβής είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία μέσω της ραδιόλυσης, δηλαδή της διαδικασίας αλληλεπίδρασής της με το νερό, μπορεί να δημιουργήσει πληθώρα επιζήμιων ενδιάμεσων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, το νερό σε διεγερμένη κατάσταση μετατρέπεται σε κατιόν (H_2O^+) και μπορεί είτε να αποσυντεθεί και να σχηματίσει ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), άτομα υδρογόνου ($\cdot\text{H}$) και άτομα οξυγόνου ($\cdot\text{O}$), είτε να αλληλεπιδράσει με ένα μόριο νερού (H_2O) προς σχηματισμού ενυδατωμένου πρωτονίου (H_3O^+) και ρίζας υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) (Εικόνα 1.2.2) (Reeves K.G. et al., 2016).



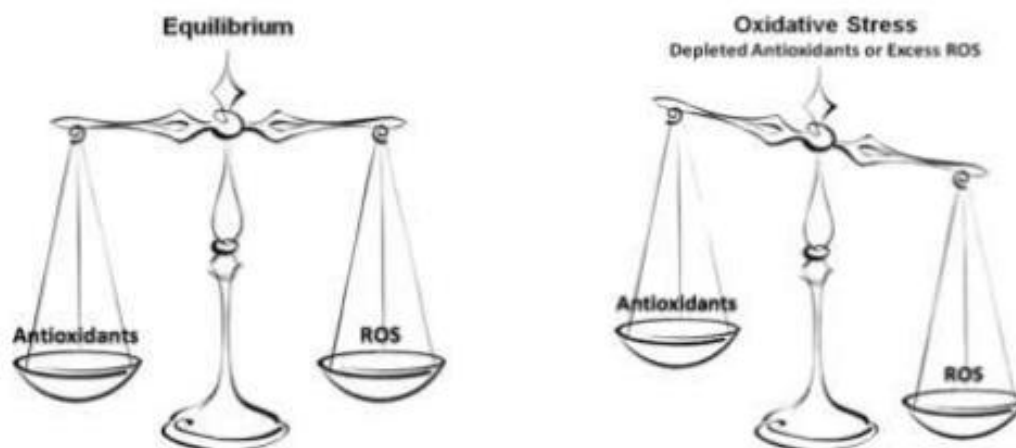
1.3 Θετικές και Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Η παρουσία ελευθέρων ριζών σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, καθώς και για φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αφού τόσο τα ουδετερόφιλα όσο και τα μακροφάγα χρησιμοποιούν τις ROS για να καταστρέψουν μικροοργανισμούς. Επιπλέον, λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων, ενώ παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη σύσπαση των μυών (Pham-Huy LA et al, 2008).

Αντίθετα, η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή ή αλλοίωση των κυττάρων μέσω υπεροξειδωσής των λιπιδίων, τροποποίησης των πρωτεϊνών ή μέσω τροποποίησης του DNA. Τα παραπάνω επηρεάζουν την ομαλή λειτουργία των κυττάρων οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο από νέκρωση ή απόπτωση (Pham-Huy LA et al, 2008).

1.4 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες δημιουργείται όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού. Πρόκειται, δηλαδή, για μια κατάσταση που σχετίζεται είτε με την αυξημένη παραγωγή ROS είτε με τη μείωση της αποτελεσματικότητας του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.3, η υπερβολική παραγωγή ROS είναι δυνατό να προκαλέσει την υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου, πρόωρης γήρανσης και εκφυλιστικών νοσημάτων. Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών, δηλαδή αν πρόκειται για περιορισμένη οξειδωτική βλάβη, το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική, φυσιολογική του κατάσταση, ενώ στην περίπτωση σοβαρών διαταραχών επάγεται κυτταρικός θάνατος, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση (Pisoschi,2015).

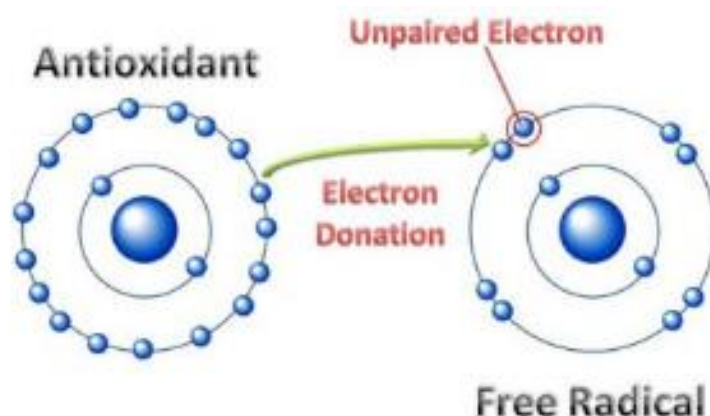


Εικόνα 1.4.1: Δημιουργία οξειδωτικού στρες

1.5 Αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα

Για την προστασία από την τοξική δράση των ελεύθερων ριζών, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα, τα οποία περιλαμβάνουν πληθώρα τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών μορίων. Στόχος τους η σταθεροποίηση

των ελευθέρων ριζών, τερματίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν (Pham-Huy LA et al, 2008).



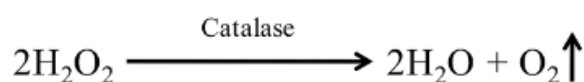
Εικόνα 1.5.1: Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών μέσω της δράσης του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος

Ο ενδογενής αντιοξειδωτικός μηχανισμός περιλαμβάνει τόσο ενζυμικές όσο και μη ενζυμικές οδούς. Τα ένζυμα με τον κυριότερο αντιοξειδωτικό ρόλο είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px). Καθένα από τα ένζυμα αυτά καταλύει διαφορετικές αντιδράσεις, επιδρώντας σε διαφορετικά υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, η δισμουτάση του υπεροξειδίου καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5.2 (Vaya J. et al.,2001).



Εικόνα 1.5.2: Η αντίδραση που καταλύεται από τη SOD

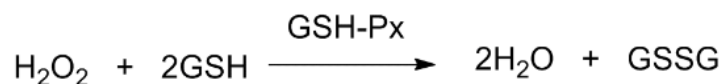
Ένα ακόμα ένζυμο με σημαντική αντιοξειδωτική δράση είναι καταλάση που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Εικόνα 1.5.3). Πρόκειται για ένα ένζυμο που περιέχει αίμη και συμμετέχει στην απομάκρυνση



Εικόνα 1.5.3: Η αντίδραση που καταλύεται από την καταλάση

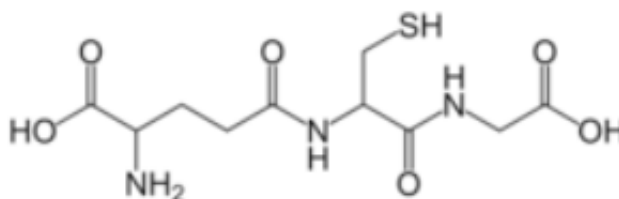
του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται στα υπεροξισώματα από τις οξειδάσες που εμπλέκονται στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και τον καταβολισμό των πουρινών (Vaya J. et al., 2001).

Μεταξύ των ενζύμων που συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών είναι και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX), η οποία καταλύει τη μετατροπή του ελεύθερου υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό (Εικόνα 1.5.4).



Εικόνα 1.5.4: Η αντίδραση που καταλύεται από την GSH-PX

Από την παραπάνω αντίδραση γίνεται φανερό ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ώστε να παραχθεί ως προϊόν η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη.



Εικόνα 1.5.5: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

Εμφανίζεται σε δύο μορφές, την ανηγμένη γλουταθειόνη και την οξειδωμένη γλουταθειόνη, με την GSSG να απαντάται στο 10% της GSH. Καθώς, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται ως δείκτης ύπαρξης οξειδωτικού στρες.

Όσον αφορά στον μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό, αυτό περιλαμβάνει μόρια που παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό αλλά και μόρια που προσλαμβάνονται από τη διατροφή. Στα μόρια που παράγει φυσιολογικά ο οργανισμός συμπεριλαμβάνονται η χολερυθρίνη, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το β-καροτένιο

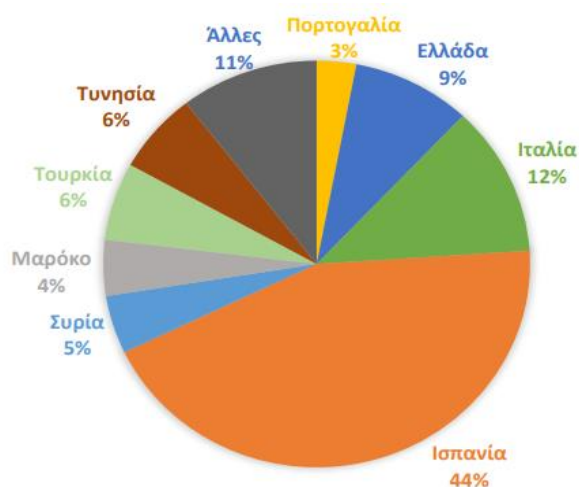
που εντοπίζονται στο αίμα, καθώς και η αλβουμίνη και το ουρικό οξύ που αντιπροσωπεύουν το 85% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ικανότητα του οργανισμού να παράγει τα μόρια που συμμετέχουν τόσο στον ενζυμικό, όσο και στον μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες, ενώ επιπλέον είναι δυνατό να επηρεάζεται από το φύλο και την ηλικία. Ωστόσο, η λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού ενός οργανισμού επηρεάζεται και από την έκθεσή του σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή και το κάπνισμα.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η διατροφή κατέχει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, καθώς μέσω της κατανάλωσης συγκεκριμένων τροφών δύναται να αυξηθεί η πρόσληψη μορίων που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C και οι πολυφαινόλες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων τροφών είναι τα εσπεριδοειδή που αποτελούν πηγή βιταμίνης C, καθώς και το ελαιόλαδο, το οποίο όπως αναφέρεται παρακάτω, είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.

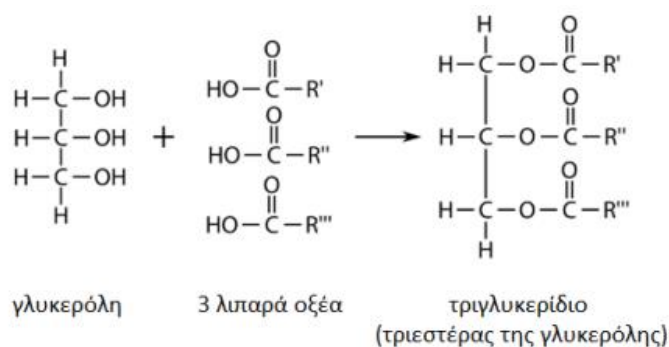
1.6 Το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής. Το 95% της παγκόσμιας παραγωγής λαδιού προέρχεται από τις μεσογειακές χώρες. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 1.6.1, η Ισπανία κατέχει την 1^η θέση στην παραγωγή και εξαγωγή ελιών και ελαιόλαδου με την Ιταλία και την Ελλάδα να εντοπίζονται στη 2^η και 3^η θέση αντίστοιχα. (Εικόνα 1.8.1)



Εικόνα 1.6.1: Κατανομή παραγωγής ελαιόλαδου

Όσον αφορά τη σύστασή του, το ελαιόλαδο αποτελείται από τριγλυκερίδια, δηλαδή από τριεστέρες γλυκερόλης με ανώτερα λιπαρά οξέα (Εικόνα 1.6.2).



Εικόνα 1.6.2: Δομή Τριγλυκεριδίου

Βάσει της δομής τους, τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε μονοακόρεστα, πολυακόρεστα και κορεσμένα. Στην περίπτωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε ποσοστό 80% συναντάται το ελαϊκό οξύ, με τα πολυακόρεστα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα να περιέχονται σε μικρότερες ποσότητες (Εικόνα 1.6.3).

Λιπαρά οξέα	Τύπος	Περιεκτικότητα
Ελαϊκό	Μονοακόρεστο	56-83%
Λινελαϊκό	Πολυακόρεστο	3,5-21%
Παλμιτικό	Κορεσμένο	7,5-20%
Στεατικό	Κορεσμένο	0,5-5%
Παλμιτελαϊκό	Μονοακόρεστο	0,3-3,5%
Λινολενικό	Πολυακόρεστο	ίχνη-1,5%

Εικόνα 1.6.3: Περιεκτικότητα ελαιολάδου σε λιπαρά

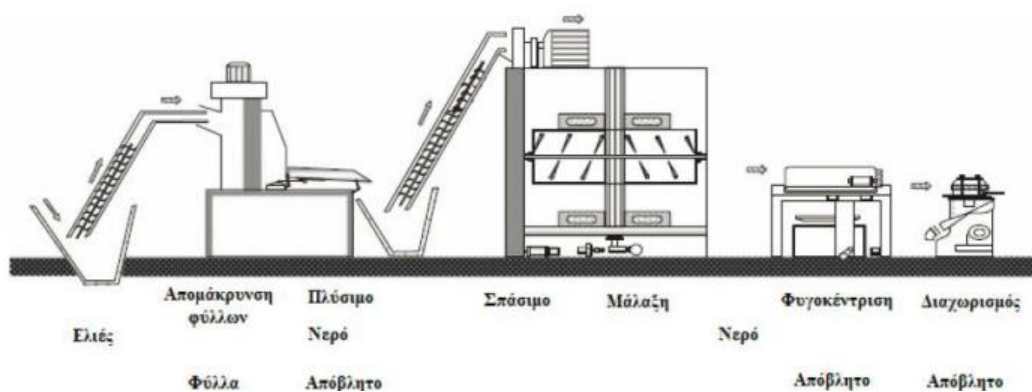
Εκτός από τα τριγλυκερίδια, στο ελαιόλαδο συναντώνται σε μικρότερα συστατικά, όπως, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, φαινόλες, βιταμίνη E, διάφορες χρωστικές και πτητικές οργανικές ενώσεις (Kiritsakis A. et al.,2020).

1.6.1 Σημασία ελαιόλαδου στη διατροφή

Το ελαιόλαδο είναι παγκοσμίως αναγνωρισμένο ως προϊόν υψηλής διατροφικής αξίας. Σε αυτό έχουν συντελέσει τόσο η διαδικασία παραγωγής του μέσω μηχανικής διεργασίας, που διατηρεί τα θρεπτικά συστατικά του όσο και η χημική του σύσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, σε πολυφαινόλες, αλειφατικές αλκοόλες, βιταμίνη E, κτλ. Για τους παραπάνω λόγους, το ελαιόλαδο αποτελεί τη βάση της μεσογειακής διατροφής, η οποία συνδέεται στενά με αύξηση του προσδόκιμου ζωής καθώς και με μειωμένες περιπτώσεις καρδιαγγειακών παθήσεων, παχυσαρκίας, ορισμένων ειδών καρκίνου και άνοιας (Kiritsakis A et al,2020).

1.6.2 Ελαιοτρίβηση

Η κυριότερη μέθοδος εξαγωγής του ελαιόλαδου από τον ελαιόκαρπο είναι η φυγοκέντρηση. Πρόκειται για μία τεχνική, κατά την οποία, με τη βοήθεια οριζόντιας φυγόκεντρου, το ελαιόλαδο διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά της ελαιοζύμης (νερό και στερεά συστατικά) βάσει του ειδικού του βάρους. Συνοπτικά η διαδικασία της ελαιοτρίβησης περιλαμβάνει οχτώ επιμέρους στάδια και απεικονίζεται στο σχήμα 1.6.2.1. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από την παραλαβή του ελαιόκαρπου και την απομάκρυνση των φύλλων πραγματοποιείται πλύσιμο αυτού, ώστε να στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η άλεσή του. Ακολούθως, η ελαιοζύμη που προκύπτει κατά την άλεση φυγοκεντρείται, ώστε να διαχωριστεί το ελαιόλαδο από τα υπόλοιπα συστατικά που αυτή περιλαμβάνει. Κατόπιν, το ελαιόλαδο καθαρίζεται και αποθηκεύεται σε κατάλληλα δοχεία.



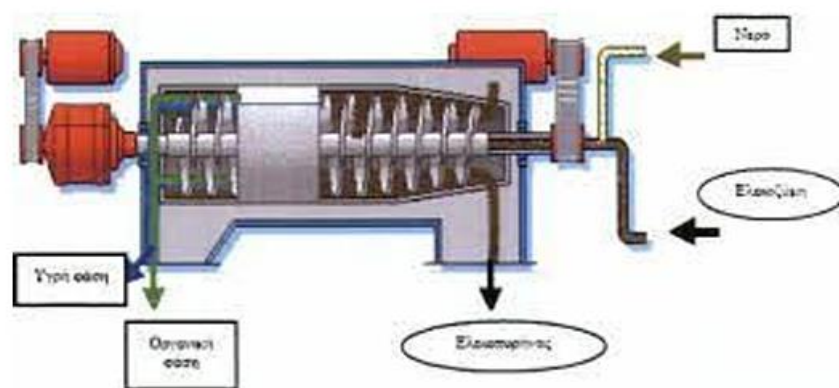
Εικόνα 1.6.2.1: Διάγραμμα ροής φυγοκεντρικού ελαιοτριβείου

Κατά την ελαιοτριβήση, εκτός από το ελαιόλαδο, προκύπτουν και υγρά απόβλητα. Μέχρι πρότινος, και ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ελαιοτριβείων μικρής παραγωγής ελαιόλαδου, τα υγρά απόβλητα απορρίπτονταν στη φύση αποτελώντας σημαντική πηγή περιβαλλοντικής ρύπανσης. Ωστόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε πολυφαινόλες, τα υγρά απόβλητα, μέσω κατάλληλης αξιοποίησης, αποτελούν ενδεχόμενη πηγή αντιοξειδωτικών. Η περαιτέρω αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων πραγματοποιείται σε ελαιοτριβεία στα οποία γίνεται χρήση φυγοκεντρικού συστήματος δύο ή τριών φάσεων. Αποτέλεσμα της χρήσης τέτοιου είδους συστημάτων είναι αφενός η μειωμένη παραγωγή υγρών αποβλήτων και αφετέρου η περαιτέρω αξιοποίησή τους για τη παρασκευή προϊόντων με αντιοξειδωτική δράση.

1.6.3 Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων

Το σύστημα τριών φάσεων διαχωρίζει την ελαιοζύμη σε τρεις διαφορετικές φάσεις: την ελαιώδη (ελαιόλαδο), τη στερεή (στερεά συστατικά) και την υδατική (υγρά συστατικά ή κατσίγαρος). Τόσο η στερεή όσο και η υδατική φάση αποτελούν τα παραπροϊόντα της ελαιοτριβήσης μέσω του τριφασικού φυγοκεντρικού συστήματος.

Η ελαιοζύμη τροφοδοτείται στην οριζόντια φυγόκεντρο, αφού σε αυτή προστεθεί νερό. Κατά τη φυγοκέντρωση, η φυγόκεντρος δύναμη οδηγεί στον διαχωρισμό των συστατικών της ελαιοζύμης βάσει του ειδικού τους βάρους.



Εικόνα 1.6.3.1: Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων

Πιο συγκεκριμένα, στο εσωτερικό της φυγόκεντρου περιστρέφεται συνεχώς ένας κοχλίας, μέσω του οποίου ωθούνται σε διαφορετικά σημεία εξόδου (διαφράγματα) το ελαιόλαδο, τα υγρά συστατικά και τα στερεά συστατικά. Αρχικά, στο πρώτο διάφραγμα καταλήγουν τα στερεά συστατικά, τα οποία αποτελούν τον ελαιοπυρήνα. Το ελαιόλαδο μαζί με τα υπόλοιπα υγρά συστατικά παραμένουν στο εσωτερικό της φυγόκεντρου και μέσω της διαρκούς λειτουργίας του κοχλίας διαχωρίζονται και εξέρχονται τελικά από δύο διαφορετικά διαφράγματα. Το ελαιόλαδο, που αποτελεί το συστατικό εκείνο με το μικρότερο ειδικό βάρος εξέρχεται τελευταίο από τη φυγόκεντρο. Ωστόσο, ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα υπόλοιπα υγρά συστατικά δεν είναι πλήρης, καθώς ένα ποσοστό νερού εντοπίζεται στο ελαιόλαδο και αντίστροφα. Ο περαιτέρω διαχωρισμός τους πραγματοποιείται σε κατακόρυφες φυγοκεντρικές συσκευές και σε υψηλότερες ταχύτητες. Η στερεή φάση (ελαιοπυρήνας) και η υδατική φάση (κατσίγαρος) αποτελούν τα παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων τριών φάσεων (Κουτσαυτάκης Α,2008).

1.6.4 Φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων

Σε αντίθεση με το φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων, στο σύστημα δύο φάσεων δεν προστίθεται νερό στην ελαιοζύμη πριν την τροφοδότηση αυτής στην οριζόντια φυγόκεντρο, παρά μόνο κατά την έναρξη της διαδικασίας ελαιτρίβησης, οπότε και το εσωτερικό της φυγόκεντρου γεμίζεται με νερό μέχρι το ήμισυ περίπου του όγκου της. Αποτέλεσμα της λειτουργίας του φυγοκεντρικού συστήματος δύο φάσεων είναι το ελαιόλαδο και μία υδαρής λάσπη, η οποία αποτελείται από τον ελαιοπυρήνα και τα υγρά που περιέχονται στην ελαιοζύμη (υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων). Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιόλαδου πραγματοποιείται σε κατακόρυφη φυγοκεντρική συσκευή, στην οποία προστίθεται ποσότητα νερού ίση με το μισή ποσότητα του παραγόμενου από την οριζόντια φυγόκεντρο ελαιόλαδου (Lastra C. et al.,2001).

Το φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα σε σχέση με αυτό των τριών φάσεων, με τα πλεονεκτήματά του, όμως να υπερτερούν συγκριτικά με αυτά του προαναφερθέντος συστήματος (Bojja R. et al.,2006). Πιο συγκεκριμένα, στα πλεονεκτήματα ενός διαφασικού φυγοκεντρικού συστήματος εντοπίζονται η παραγωγή καλύτερης ποιότητας ελαιόλαδου, το οποίο, λόγω του ότι περιέχει υψηλές ποσότητες πολυφαινολών, έχει μεγαλύτερη αντοχή στην

οξειδωση, η μειωμένη κατανάλωση νερού, αλλά και η μειωμένη παραγωγή υγρών αποβλήτων (Κουτσαυτάκης Α, 2008).

1.6.5 Παραπροϊόντα ελαιοτριβίσης

Όπως αναφέρθηκε στις παραγράφους 1.6.3 και 1.6.4, κατά τη λειτουργία του φυγοκεντρικού συστήματος τόσο των δύο όσο και των τριών φάσεων, παράγονται δύο ειδών παραπροϊόντα: ο ελαιοπυρήνας και τα υδατικά απόβλητα ελαιοτριβείων (ΥΑΕ).

Ο ελαιοπυρήνας περιλαμβάνει, τα στερεά συστατικά του ελαιόκαρπου, δηλαδή τη σάρκα, το κουκούτσι και το περίβλημα. Αποτελεί ένα εμπορικής αξίας παραπροϊόν καθώς είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία του προς παραγωγή πυρηνέλαιου και πυρηνόξυλου, το οποίο χρησιμοποιείται ως καύσιμο.

Τα υδατικά απόβλητα του ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, η οποία οφείλεται στο νερό που περιέχει ο ίδιος ο ελαιόκαρπος και στο νερό που χρησιμοποιείται κατά την πλύση και την επεξεργασία αυτού. Εκτός του νερού, τα υδατικά απόβλητα περιλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες οργανικών και ανόργανων συστατικών. Το μεγαλύτερο μέρος του οργανικού κλάσματος αποτελείται από φαινολικές ενώσεις, όπως η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη, το κουμαρικό οξύ και η καεμφορόλη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα που προσδίδουν στα υδατικά απόβλητα, αλλά και για τις αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Kapellakis E. et al., 2012, Frankel E. et al., 2013).

Υπολογίζεται ότι στην περιοχή της Μεσογείου παράγονται ετησίως περίπου 30 εκατομμύρια m³ υδατικών αποβλήτων ελαιοτριβείων. Λόγω του υψηλού οργανικού τους φορτίου, η απόρριψή τους στο φυσικό περιβάλλον τα καθιστά σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους. Για το λόγο αυτό, και λαμβάνοντας υπόψη τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές, που εφαρμόζονται σε υψηλής κλίμακας παραγωγής ελαιοτριβεία, οι οποίες συμβάλλουν στην περαιτέρω αξιοποίησή τους (Agalias A. et al., 2007, Rinaldi M. et al., 2003). Ένας τρόπος περαιτέρω αξιοποίησης των υδατικών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι η χρήση τους προς εμπλουτισμό ζωοτροφών, με στόχο τον έλεγχο της δράσης τους ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Τέτοιες μελέτες έχουν ήδη αρχίσει να εφαρμόζονται σε εκτεταμένο βαθμό σε ιχθυοκαλλιέργειες, στις οποίες καλλιεργούνται ψάρια, όπως ο σολομός. Υπάρχουν ήδη και μελλοντικές προσεγγίσεις για την παρασκευή

διατροφικών σκευασμάτων κατάλληλων προς κατανάλωση από τον άνθρωπο, όμως τέτοιου είδους μελέτες είναι αρκετά χρονοβόρες και υψηλού κόστους (Agalias A. et al., 2007, Rinaldi M. et al., 2003).

1.7 Ο σολομός

Ο σολομός αποτελεί υψηλής διατροφικής αξίας τροφή για τον άνθρωπο, καθώς οι ευεργετικές τους ιδιότητες έχουν αντίκτυπο στο ανοσοποιητικό σύστημα, την καρδιά και την πνευματική διαύγεια. Πρόκειται για ένα ψάρι που χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε Ω-3 λιπαρά, ενώ επιπλέον περιέχει τις ίδιες περίπου ποσότητες πρωτεϊνών με το κρέας, σε σχέση με το οποίο περιέχει και λιγότερη χοληστερόλη. Εκτός από πηγή πρωτεϊνών, ο σολομός αποτελεί και σημαντική πηγή καλίου, φωσφόρου και βιταμινών.

	ΕΝΕΡΓΕΙΑ (Kcal)	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (gr.)	ΛΙΠΗ (gr.)	Ω-3 Λ.Ο. (mg)	ΧΟΛΗΣΤΕ- ΡΟΛΗ (mg)	ΒΙΤΑΜ. Α (IU)	ΒΙΤΑΜ. D (IU)	ΒΙΤ. B12 (mcg)	ΑΣΒΕΣΤΙΟ (mg)	ΣΙΔΗΡΟΣ (mg)	ΦΩΣΦΟ- ΡΟΣ (mg)
ΣΟΛΟΜΟΣ	142	19,8	6,3	2018	55	40	1300	3,2	12,0	0,8	200

Εικόνα 1.7.1: Διατροφική αξία σολομού. United States Department of Agriculture (USDA)

Διακρίνονται τρεις κατηγορίες σολομών: αυτοί που προέρχονται από τον Ειρηνικό Ωκεανό (*Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus gorbusha*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus masou* και *Oncorhynchus rhodurus*), αυτοί που προέρχονται από τον Ατλαντικό Ωκεανό (*Salmo salar*) και οι σολομοί του Δούναβη (*Hucho hucho*). Από τις παραπάνω κατηγορίες σολομών, το κυριότερο εκτρεφόμενο είδος είναι ο σολομός του Ατλαντικού και ιδιαίτερα ο Νορβηγικός σολομός, ο οποίος αντιστοιχεί στο 93% της συνολικής παραγωγής από υδατοκαλλιέργεια (Kyle G. & Yosuke K., 2017).

2 ΣΤΟΧΟΣ

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, ασχοληθήκαμε με την αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων που προέρχονται από διαφασικό ελαιοτριβείο για την παραγωγή ελαιόλαδου. Σε αυτά τα υγρά απόβλητα απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις οι πολυφαινόλες, οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική άμυνα των ζώων αυξάνοντας τα αντιοξειδωτικά επίπεδα των ενδογενών μορίων και ενζύμων, ενώ ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι, με βάση το παραπάνω σκεπτικό, δημιουργήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με απόβλητα διαφασικού ελαιοτριβείου, η οποία χορηγήθηκε ως διατροφή σε σολομούς.

Σκοπός του πειράματος ήταν η εκτίμηση της επίδρασης αυτής της ζωοτροφής στην οξειδοαναγωγική κατάσταση στον ιστό αίματος των σολομών. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν δείγματα αίματος σολομών, που προσέλαβαν εμπλουτισμένη ζωοτροφή, ως προς τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και συγκρίθηκαν με αντίστοιχα δείγματα αίματος σολομών ελέγχου, που προσέλαβαν φυσιολογική διατροφή, χωρίς την ενσωμάτωση των προς εξέταση παραπροϊόντων.

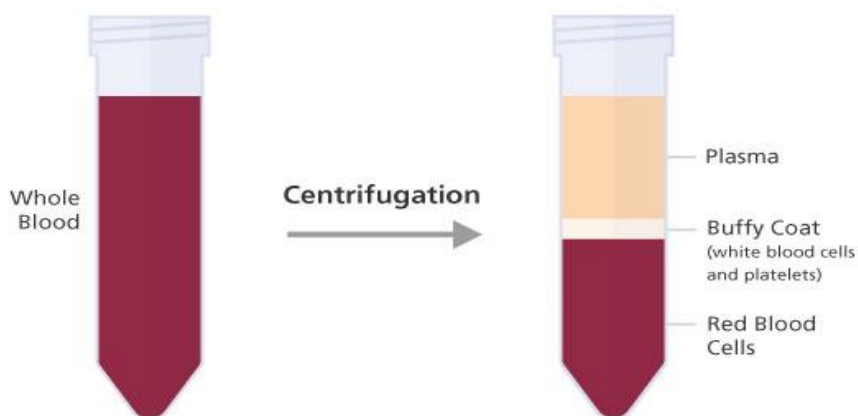
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργαστηριακής μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 240 δείγματα αίματος σολομού. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από 24 διαφορετικές δεξαμενές (tanks) και 10 σολομούς για καθεμιά από αυτές. Σε 12 δεξαμενές χορηγήθηκε φυσιολογική ζωοτροφή και τα δείγματα που συλλέχθηκαν από αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control), ενώ στις υπόλοιπες 12 δεξαμενές χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου, με τα δείγματα που συλλέχθηκαν από αυτές να αποτελούν τα δείγματα μελέτης (treatment). Τόσο η φυσιολογική όσο και εμπλουτισμένη ζωοτροφή χορηγήθηκαν για 6 εβδομάδες μετά την εκκόλασή τους, οπότε και δείγματα συλλέχθηκαν μετά το πέρας της 6^{ης} εβδομάδας.

3.2 Επεξεργασία δειγμάτων αίματος

1ml από κάθε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε μετά το πέρας των 6 εβδομάδων, τοποθετήθηκε σε κατάλληλα σωληνάρια που περιείχαν 200μl του αντιπηκτικού παράγοντα ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) συγκέντρωσης 7,5%. Στη συνέχεια, και έπειτα από φυγοκέντρηση που πραγματοποιήθηκε για 10 λεπτά στα 1.370g και στους 4°C για κάθε σωληνάριο ξεχωριστά, διαχωρίστηκε το πλάσμα, το οποίο συλλέχθηκε, με στόχο να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των TBARS και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.



Εικόνα 3.2.1: Διαχωρισμός πλάσματος και ερυθροκυττάρων μέσω φυγοκέντρησης

Στην υπόλοιπη ποσότητα αίματος, στην οποία περιέχονταν τα ερυθροκύτταρα ως ίζημα, προστέθηκε, αρχικά, απιονισμένο νερό (dH₂O) σε αναλογία 1:1 v/v. Κατόπιν, ύστερα από βίαιη ανακίνηση του σωληναρίου, πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στα 4.000g και στους 4°C. Ακολούθως, συλλέχθηκε το υπερκείμενο, δηλαδή το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (red blood cell lysate-RBCL), οπότε και υποβλήθηκε σε καθαρισμό. Πιο συγκεκριμένα, 500μL RBCL προστέθηκαν σε 500μL Trichloroacetic acid (TCA), συγκέντρωσης 5%. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 22.000g για 5 λεπτά στους 5°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, συλλέχθηκαν 300μl υπερκειμένου, στα οποία προστέθηκαν 90μL TCA συγκέντρωσης 5%. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 22.000g και στους 5°C. Τέλος, συλλέχθηκαν 100μl του υπερκειμένου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

3.3 Προσδιορισμός Αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin-Hb)

Ο υπολογισμός της αιμοσφαιρίνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (RBCL), που προέκυψε κατά την επεξεργασία των δειγμάτων αίματος, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2, είναι απαραίτητος για τον επακόλουθο προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

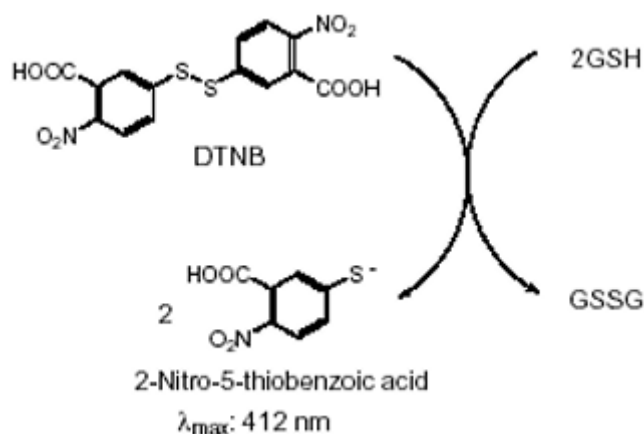
Ο προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης γίνεται μέσω της μεθόδου του hemiglobincyanide (HiCN). Πιο συγκεκριμένα, σε πλαστικά σωληνάρια Eppendorf 2ml προστέθηκαν 5μl δείγματος RBCL και 1ml του φωτοευαίσθητου αντιδραστηρίου R1 (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία), pH 7.3, αραίωσης 1:10 και περιεκτικότητας 0,60mmol/l Potassium ferricyanide, 0,90mmol/l Potassium cyanide και 2mmol/l Dihydrogen potassium phosphate. Ακολούθησαν ισχυρή ανάδευση (vortex), επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι και μέτρηση οπτικής απορρόφησης (A) στα 540nm με τη χρήση πλαστικής κυψελίδας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε δείγμα-τυφλό που περιείχε 1ml του αντιδραστηρίου R1. Τέλος, με στόχο την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας του πειράματος, η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540nm τόσο του δείγματος-τυφλού όσο και καθενός από τα δείγματα RBCL, πραγματοποιήθηκε τρεις φορές διαδοχικά.

Μετά το πέρας των μετρήσεων της απορρόφησης, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, μέσω της εξίσωσης:

$$Hb \left(\frac{g}{dl} \right) = (A \text{ sample} - A \text{ blank}) \times 29.4$$

3.4 Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)

Η μέθοδος προσδιορισμού της ανηγμένης γλουταθειόνης βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το 5,5'-διθειοδις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB). Πιο συγκεκριμένα, η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και ένα έγχρωμο προϊόν, το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, που απορροφάει στα 412nm (Εικόνα 3.4.1).



Εικόνα 3.4.1: Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης

Σε πλαστικούς σωλήνες Eppendorf των 2ml προστέθηκαν 660 μL Phosphate buffer (KH₂PO₄, Na₂HPO₄) περιεκτικότητας 67mM και pH 7.95, 330μl DTNB περιεκτικότητας 1mM και 20μl δείγματος RBCL. Ακολούθησαν ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 412nm με τη χρήση πλαστικής κυψελίδας. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κατά τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε δείγμα-τυφλό, το οποίο παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη 660μl Phosphate buffer (KH₂PO₄, Na₂HPO₄) περιεκτικότητας 67mM και pH 7.95, 330μl DTNB περιεκτικότητας 1mM και 20μl H₂O.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις για το σύνολο των δειγμάτων, υπολογίστηκε η δραστηριότητα της GSH, βάσει της εξίσωσης:

$$GSH (mmol/l) = (A sample - A blank / 13,6) \times 262,6$$

- Συντελεστής αραίωσης: 262,6
- Συντελεστής μοριακής απόσβεσης DTNB: 13,6

Στην παραπάνω εξίσωση, ο συντελεστής αραίωσης προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1.010μl) που περιέχεται στον πλαστικό σωλήνα Eppendorf με τον όγκο του δείγματος RBCL (20μl). Το αποτέλεσμα της διαίρεσης πολλαπλασιάζεται εν συνεχεία επί 2, καθώς συνυπολογίζεται η αραίωση 1:1 που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και ακολουθεί ο διπλασιασμός του γινομένου και ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός αυτού επί 1.3, αφού συνυπολογίζεται τόσο η πρώτη (500μl αιμολ. / 500μl 5% TCA) όσο και η δεύτερη αραίωση (390μl/300μl) που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα RBCL μετά την προσθήκη TCA περιεκτικότητας 5% για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη (mmol/ g Hb). Όπως φαίνεται από την εξίσωση της παραγράφου 3.3, η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης εκφράζεται g/dl, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση της GSH που εκφράζεται σε mmol/l. Απαιτείται, λοιπόν, ο πολλαπλασιασμός της τιμής της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης επί 10 και κατόπιν διπλασιασμός του γινομένου, ώστε να γίνει μετατροπή του g/dl σε g/l, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη την 1:1 αραίωση που πραγματοποιήθηκε κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

3.5 Προσδιορισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)

Η μέθοδος του προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν ορισμένα συστατικά του, όπως το ουρικό οξύ και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο κατά την οποία χρησιμοποιείται η ρίζα DPPH• (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνου προκαλείται η αναγωγή της εν λόγω ρίζας προς σχηματισμό υδραζίνης (1,1- diphenyl-

2-picrylhydrazine), μιας ένωσης που προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520nm.

Για τη διεξαγωγή της μεθόδου σε πλαστικούς σωλήνες Eppendorf των 2ml προστέθηκαν 480 μ L Phosphate buffer (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) περιεκτικότητας 10mM και pH 7.4, 500 μ l DPPH περιεκτικότητας 0,1mM και 20 μ l πλάσματος. Ακολούθησαν ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε, αρχικά φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 20.000g και στους 25°C, με στόχο την καταβύθιση τυχόν σωματιδίων που μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφηση και στη συνέχεια μέτρηση της απορρόφησης στα 520nm με τη χρήση πλαστικής κυψελίδας. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κατά τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν ένα δείγμα-τυφλό, το οποίο παρασκευάστηκε έπειτα από προσθήκη 500 μ l Phosphate buffer (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) περιεκτικότητας 10mM και pH 7.4 και 500 μ l DPPH περιεκτικότητας 0,1mM, καθώς κι ένα δείγμα ως θετικό control στο οποίο περιέχονταν 495 μ l Phosphate buffer (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) περιεκτικότητας 10mM και pH 7.4, 500 μ l DPPH περιεκτικότητας 0,1mM και 5 μ l ασκορβικού οξέος περιεκτικότητας 10mM.

Μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων της απορρόφησης, τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν είτε ως % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, μέσω της εξίσωσης:

$$\%A \text{ μείωση} = \frac{A \text{ blank} - A \text{ sample}}{A \text{ blank}} \times 100$$

είτε με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\frac{\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = [(\% A \text{ μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$$

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι στις παραπάνω εξισώσεις η διαίρεση με το 100 αποσκοπεί στη μετατροπή της ποσοστιαίας μείωσης της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης. Επιπλέον στη 2^η εξίσωση παρατηρούνται δύο πολλαπλασιασμοί με τον αριθμό 50. Ο πρώτος εκ των δύο πολλαπλασιασμών πραγματοποιείται διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μ mol/l της κυψελίδας, ενώ ο δεύτερος γιατί η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-

πλάσμα. Τέλος, η διαίρεση με τον αριθμός 1000 είναι απαραίτητη για τη μετατροπή των L του πλάσματος σε ml ορού.

3.6 Προσδιορισμός TBARS

Η μέθοδος προσδιορισμού TBARS (**T**hio**b**arbituric **a**cid **r**eactive **s**ubstances) βασίζεται στον προσδιορισμό των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και οι οποίες σχηματίζονται ως παραπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Κύριο παραπροϊόν της διάσπασης των λιπιδίων είναι η μηλονική δυαλδεϋδη (MDA), η οποία αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, σχηματίζοντας μια ένωση που προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Για τη διεξαγωγή της μεθόδου, σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15ml προστίθενται 100μl πλάσματος από κάθε δείγμα της παραγράφου 3.1, 500μl Tris-HCL και 500μl TCA συγκέντρωσης 35%. Καθώς πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο, γίνεται παρασκευή δείγματος-τυφλού, έπειτα από την προσθήκη 500μl Tris-HCL, 500μl TCA και 100μl dH₂O. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετά το πέρας της οποίας προστίθεται 1mL Na₂SO₄ – TBA, οπότε και πραγματοποιείται εκ νέου επώαση για 45 λεπτά στους 95°C σε υδατόλουτρο. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, οι σωλήνες μεταφέρονται στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτούς 1 mL TCA περιεκτικότητας 70%. Κατόπιν, 1ml του συγκεκριμένου διαλύματος μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες Eppendorf των 2ml και υπόκειται σε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 11.200g και στους 25°C. Το πέρας της φυγοκέντρησης ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 530nm με τη χρήση γυάλινης κυψελίδας.

Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης γίνονται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$TBARS (\mu\text{mol/L}) = (A \text{ sample} - A \text{ blank}) / 0,156 \times 31$$

- Συντελεστής αραίωσης: 31
- Συντελεστής μοριακής απόσβεσης MDA ($\mu\text{mol/l}$) : 0,156

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στην παραπάνω εξίσωση, ο συντελεστής αραίωσης προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3.100μl) που περιέχεται στον πλαστικό σωλήνα Eppendorf με τον όγκο του πλάσματος (100μl).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Υπολογισμός Αιμοσφαιρίνης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3 η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στα δείγματα αίματος υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$Hb \left(\frac{g}{dl} \right) = (A \text{ sample} - A \text{ blank}) \times 29.4$$

Έτσι οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

Δεξαμενή	A Sample	A Blank	Hb (g/dL)
1	0.34	0.041	8.87
2	0.37	0.041	9.67
4	0.31	0.035	8.17
6	0.32	0.043	8.35
8	0.39	0.043	10.17
9	0.36	0.034	9.41
12	0.26	0.044	6.41
14	0.38	0.031	10.27
21	0.30	0.045	7.43
23	0.29	0.045	7.25
MEAN	0,332	0,0402	8.60

Οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα αίματος σολομών που προσέλαβαν την πειραματική ζωοτροφή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

Δεξαμενή	A Sample	A Blank	Hb (g/dL)
3	0.25	0.035	6.28
5	0.30	0.034	7.85
7	0.32	0.030	8.43
10	0.31	0.047	7.68
11	0.22	0.044	5.08
13	0.39	0.041	10.38
15	0.25	0.035	6.24
16	0.31	0.046	7.67
17	0.29	0.042	7.42
18	0.26	0.039	6.47
19	0.24	0.030	6.17
20	0.21	0.041	5.01
22	0.21	0.044	4.97
24	0.32	0.042	8.15
MEAN	0.277	0.039	6.98

4.2 Υπολογισμός Ανηγγμένης Γλουταθειόνης (GSH)

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 η δραστικότητα της GSH στα δείγματα αίματος υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$GSH \text{ (mmol/l)} = (Abs \text{ δείγματος} - Abs \text{ τυφλού} / 13,6) \times 262,6$$

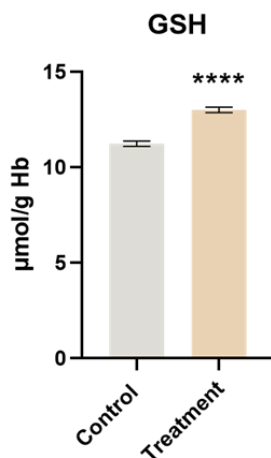
Έτσι οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

Δεξαμενή	A Sample	A Blank	GSH (mmol/L)	GSH (μmol/g Hb)
1	0.200	0.097	1.989	11.2
2	0.223	0.107	2.230	11.7
4	0.194	0.094	1.919	11.8
6	0.193	0.091	1.977	12.2
8	0.202	0.091	2.146	10.6
9	0.188	0.087	1.951	10.5
12	0.168	0.096	1.399	11.5
14	0.197	0.090	2.058	10.1
21	0.182	0.095	1.681	11.7
23	0.172	0.089	1.609	11.1
			MEAN	11.2
			SD	0.63

Οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα αίματος σολομών που προσέλαβαν την πειραματική ζωοτροφή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

Δεξαμενή	A Sample	A Blank	GSH (mmol/L)	GSH (μmol/g Hb)
3	0.181	0.094	1.690	13.5
5	0.210	0.097	2.185	14.0
7	0.189	0.083	2.048	12.1
10	0.201	0.100	1.953	12.7
11	0.164	0.098	1.259	12.4
13	0.222	0.088	2.585	12.5
15	0.169	0.091	1.498	12.1
16	0.182	0.086	1.846	12.2
17	0.205	0.104	1.957	13.2
18	0.177	0.091	1.662	12.9
19	0.174	0.088	1.654	13.7
20	0.163	0.092	1.385	14.6
22	0.167	0.103	1.246	12.8
24	0.210	0.099	2.150	13.3
			MEAN	13.0
			SD	0.76

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, προέκυψε το παρακάτω γράφημα (Εικόνα 4.2.1):



Εικόνα 4.2.1: Επίδραση στον δείκτη οξειδωτικού στρες GSH σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου. (**** υποδηλώνει $p < 0.0001$)

Κατά τη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), εντοπίστηκε διαφορά μεταξύ του μέσου όρου επιπέδων στα δείγματα ελέγχου (control) και στα δείγματα προέρχονταν από σολομούς που είχαν προσλάβει την ζωοτροφή. Συγκεκριμένα, η διαφορά που παρουσιάστηκε ήταν στατιστικώς σημαντική, ($p=0.00037$).

4.3 Υπολογισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 η δραστικότητα της GSH στα δείγματα αίματος υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = [(\% \text{ A μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$$

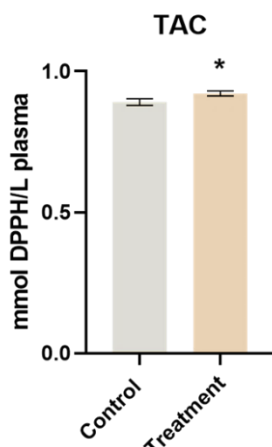
Έτσι οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

ΔΕΞΑΜΕΝΗ	TAC mmol DPPH/L
1	0.83
2	0.86
4	0.87
6	1.01
8	0.9
9	0.89
12	0.72
14	1.05
21	0.92
23	0.86
MEAN	0.89
SD	0.08

Οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα αίματος σολομών που προσέλαβαν την πειραματική ζωοτροφή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

ΔΕΞΑΜΕΝΗ	TAC mmol DPPH/L
3	0.90
5	0.86
7	0.97
10	0.91
11	0.69
13	1.11
15	0.89
16	1.01
17	0.88
18	0.87
19	0.88
20	0.99
22	0.85
24	0.88
MEAN	0.91
SD	0.09

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, προέκυψε το παρακάτω γράφημα (Εικόνα 4.3.1):



Εικόνα 4.3.1: Επιδράσεις στον δείκτη οξειδωτικού στρες TAC σε πλάσμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου, (* υποδηλώνει $p < 0.05$).

Κατά τη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC, παρουσιάστηκε αύξηση των επιπέδων στην ομάδα των σολομών που κατανάλωσαν την εμπλουτισμένη ζωοτροφή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική με $p=0.042$.

4.4 Υπολογισμός TBARS

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4, οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης γίνονται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$TBARS (\mu\text{mol/L}) = (A \text{ sample} - A \text{ blank}) / 0,156 \times 31$$

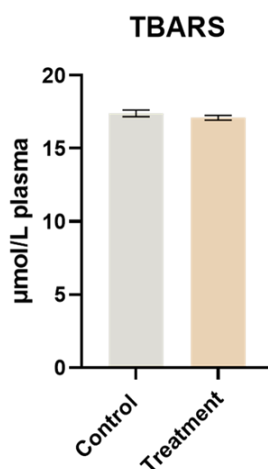
Έτσι οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

ΔΕΞΑΜΕΝΗ	TBARS μmol/L
1	17.97
2	20.50
4	17.86
6	16.46
8	19.63
9	14.69
12	17.19
14	18.89
21	15.26
23	15.45
MEAN	17.39
SD	1.84

Οι τιμές που προέκυψαν έπειτα από τη φωτομέτρηση στα δείγματα αίματος σολομών που προσέλαβαν την πειραματική ζωοτροφή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ως μέση τιμή για την κάθε δεξαμενή:

ΔΕΞΑΜΕΝΗ	TBARS μmol/L
3	17.67
5	16.79
7	16.7
10	16.78
11	15.41
13	17.36
15	17.83
16	16.86
17	17.95
18	18.13
19	14.91
20	19.46
22	15.01
24	18.40
MEAN	17.09
SD	1.31

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, προέκυψε το παρακάτω γράφημα (Εικόνα 4.4.1):



Εικόνα 4.4.1: Επιδράσεις στον δείκτη των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS σε πλάσμα σολομών μετά από χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένη με απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου.

Κατά τη μέτρηση των TBARS, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και των treated δειγμάτων δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκε μια μικρή μείωση, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$).

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες δημιουργείται όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός οργανισμού και είναι δυνατό να προκαλέσει την υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου, πρόωρης γήρανσης και εκφυλιστικών νοσημάτων. Για την προστασία από την τοξική δράση των ελευθέρων ριζών, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα, τα οποία περιλαμβάνουν πληθώρα τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών μορίων (Pham-Huy LA et al, 2008). Η ικανότητα του οργανισμού να παράγει τα μόρια που συμμετέχουν τόσο στον ενζυμικό, όσο και στον μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες, ενώ επιπλέον είναι δυνατό να επηρεάζεται από το φύλο και την ηλικία. Ωστόσο, η λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού ενός οργανισμού επηρεάζεται και από την έκθεσή του σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή και το κάπνισμα.

Το ελαιόλαδο είναι παγκοσμίως αναγνωρισμένο ως προϊόν υψηλής διατροφικής αξίας. Σε αυτό έχουν συντελέσει τόσο η διαδικασία παραγωγής του μέσω μηχανικής διεργασίας, που διατηρεί τα θρεπτικά συστατικά του όσο η χημική του σύσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, σε πολυφαινόλες, αλειφατικές αλκοόλες, βιταμίνη E, κτλ. Κατά την ελαιοτριβήση, εκτός από το ελαιόλαδο, προκύπτουν και υγρά απόβλητα. Τα υδατικά απόβλητα του ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) εκτός του νερού, περιλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες οργανικών και ανόργανων συστατικών. Το μεγαλύτερο μέρος του οργανικού κλάσματος αποτελείται από φαινολικές ενώσεις, όπως η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη, το κουμαρικό οξύ και η καεμφερόλη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα που προσδίδουν στα υδατικά απόβλητα, αλλά και για τις αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Kapellakis E. et al., 2012, Frankel E. et al., 2013).

Η σύνθεση της τροφής σολομού ποικίλλει ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις των ψαριών και τις χρησιμοποιούμενες πρακτικές εκτροφής. Τα κύρια συστατικά της τροφής σολομού περιλαμβάνουν συνήθως ιχθυάλευρα, ιχθυέλαιο, φυτικές πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα. Αυτά τα συστατικά είναι προσεκτικά

διαμορφωμένα για να παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τη βέλτιστη ανάπτυξη και υγεία του σολομού. Ενώ οι πολυφαινόλες της ελιάς μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την ανθρώπινη υγεία, η συμπερίληψή τους στις ζωοτροφές σολομού δεν είναι κοινή πρακτική μέχρι στιγμής. Ο πρωταρχικός στόχος της σύνθεσης της τροφής σολομού είναι να καλύψει τις διατροφικές ανάγκες των ψαριών και να προωθήσει την ανάπτυξή τους, και τη συνολική ευημερία τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας διερευνώνται εναλλακτικά συστατικά ζωοτροφών για τη μείωση της εξάρτησης από ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια που προέρχονται από ψάρια που αλιεύονται άγρια. Η έρευνα συνεχίζεται για τον εντοπισμό νέων και βιώσιμων πηγών ζωοτροφών που μπορούν να παρέχουν βασικά θρεπτικά συστατικά για τα εκτρεφόμενα ψάρια διατηρώντας παράλληλα την υγεία και την ποιότητά τους. Σε αυτό το πλαίσιο ο εμπλουτισμός των συγκεκριμένων ζωοτροφών με συστατικά που προσδίδουν αξία την υγεία των ψαριών διερευνάται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η οξειδοαναγωγική κατάσταση σολομών, οι οποίοι τράφηκαν με ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα που προέρχονταν από διφασικό ελαιοτριβείο. Για το πείραμα χορήγησης υγρών αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελούνταν από σολομούς που τρέφονταν με κανονική τροφή (control) και μία πειραματική ομάδα (treated), που αποτελούνταν από σολομούς που τρέφονταν με τροφή εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 24 tanks, καθένα από τα οποία αποτελούνταν από 10 σολομούς. Η διακοπή της χορήγησης των ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε στις 6 εβδομάδες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη του αίματος. Ακολούθως, μετρήθηκαν βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συγκεκριμένα τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου ενίσχυσε τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των σολομών. Αρχικά, το TAC, ο δείκτης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, αυξήθηκε στο πλάσμα της ομάδας σολομών που δόθηκε η εμπλουτισμένη ζωοτροφή με ΥΑΕ, σε σύγκριση με αυτό της ομάδας ελέγχου. Η σημασία της αύξησης αυτής αντικατοπτρίζεται από το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος δείκτης, αποτελεί ένα μέτρο

εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης ενός οργανισμού, καθώς αναφέρεται στην ικανότητα των επιμέρους συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

Η GSH στα ερυθροκύτταρα ήταν ένα άλλο σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο που αυξήθηκε μετά τη χορήγηση πολυφαινόλων από ΥΑΕ μέσω της εμπλουτισμένης ζωοτροφής. Παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τους βιοδείκτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, αύξηση η οποία ήταν και στατιστικώς σημαντική. Οι μοριακοί μηχανισμοί που αντιστοιχούν στις πολυφαινόλες από την επαγόμενη από ΥΑΕ αύξηση στα επίπεδα GSH μπορεί να είναι οι εξής: (i) αύξηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH (π.χ. λιγάση g-γλουταμυλοκυστεΐνης και συνθετάση GSH), (ii) εφεδρική GSH από την αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες με την άμεση σάρωση τους και (iii) αύξηση της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR).

Τέλος, η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με ΥΑΕ φαίνεται να μην επηρέασε σημαντικά την υπεροξείδωση των λιπιδίων στο πλάσμα των σολομών, δεδομένου ότι τα επίπεδα TBARS της πειραματικής ομάδας δεν διέφεραν σημαντικά από τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, αν και παρατηρήθηκε μια μικρή ελάττωση στα επίπεδα της πειραματικής ομάδας. Αυτή η ελάττωση αντιστοιχεί σε ελάττωση των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, κάτι που συνεπάγεται τη μείωση της έκτασης της καταστροφής των λιπιδίων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, όπου παρατηρήθηκε η αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών σε χοίρους, κοτόπουλα και πρόβατα κρεατοπαραγωγής, έπειτα από την κατανάλωση βιολειτουργικών ζωοτροφών εμπλουτισμένων με παραπροϊόντα ελαιοτριβείων (Gerasopoulos et al., 2015a; Gerasopoulos et al., 2015b; Papadopoulou et al., 2017; Makri et al., 2017; Makri et al. 2018; Makri et al. 2020).

Είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι το οξειδωτικό στρες καθώς και η φλεγμονή είναι οι κύριες ανωμαλίες που κρύβονται πίσω από τον νευροεκφυλισμό και ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, αποκαθιστούν τη λειτουργία των νευρώνων μέσω της βελτίωσης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Ορισμένες ευεργετικές επιδράσεις της κατανάλωσης πολυφαινόλων περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές,

νευροπροστατευτικές, αντιγηραντικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες. Έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ασκούν την προστατευτική τους δράση μέσω της ικανότητάς τους να προστατεύουν το DNA από το οξειδωτικό στρες, να αναστέλλουν τη μιτοχondριακή δυσλειτουργία και να μειώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλώντας μείωση των ελευθέρων ριζών, και διατηρώντας τα ενδογενή επίπεδα αντιοξειδωτικών σε φυσιολογικά επίπεδα. Οι πολυφαινόλες του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου ως αντιοξειδωτικά και ως ήπια προοξειδωτικά, με επακόλουθη ανοδική ρύθμιση της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου. Κατά συνέπεια, μπορούν να θεωρηθούν ως παράγοντες φαινομένων όρμησης. Για παράδειγμα, η τυροσόλη αυξάνει τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* ενεργοποιώντας την απόκριση θερμικού σοκ. Οι Martin et al. ανέφεραν ότι οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, όπως η υδροξυτυροσόλη, αυξάνουν την ενζυματική δραστηριότητα και την έκφραση των ενζύμων που σχετίζονται με την GSH, όπως τα GR, GPx, GST μέσω της οδού σηματοδότησης Nrf2 (Martín MA et al., 2010). Οι Kouka et al. έχουν επίσης αποδείξει ότι τα ελληνικά ελαιόλαδα με διαφορετική πολυφαινολική σύνθεση αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα αντιοξειδωτικά ένζυμα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Kouka P et al., 2019).

Οι προαναφερθείσες ευεργετικές επιδράσεις των ΥΑΕ αποδίδονται βασικά στην περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Η βιολειτουργική τροφή συμπληρωμένη με ΥΑΕ άσκησε διπλάσια αντιοξειδωτική δράση από την τυπική/συμβατική τροφή (Makri et al., 2018) και, επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν ήδη αναφέρει ότι οι πολυφαινόλες ρυθμίζουν εν μέρει τη δραστηριότητα των ενζύμων φάσης I και φάσης II, ιδιαίτερα ενζύμων που σχετίζονται στη βιοσυνθετική οδό GSH (Boone et al., 2000). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες των ΥΑΕ, όπως η υδροξυτυροσόλη, μπορεί να επάγουν την έκφραση του γονιδίου GST και της πρωτεΐνης στα κύτταρα μέσω της οδού Nrf2 (Martin et al., 2010), η οποία είναι ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός έναντι του οξειδωτικού στρες (Nakagami et al., 2016).

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παραγωγή ελαιόλαδου σε διφασικά ελαιοτριβεία παράγονται υγρά απόβλητα, τα οποία αποτελούνται κυρίως από το νερό που χρησιμοποιείται για την πλύση του καρπού αλλά και από υγρά του ίδιου του καρπού, τα οποία είναι πλούσια σε οργανικό φορτίο και κυρίως σε φαινόλες. Οι φαινόλες λοιπόν, είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), τα οποία θεωρούνται σημαντικοί περιβαλλοντικοί ρύποι. Σε αυτό το πλαίσιο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η αξιοποίησή τους για την παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση των χρήσιμων συστατικών τους. Για τον λόγο αυτόν λοιπόν, δημιουργήθηκαν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα διφασικού ελαιοτριβείου και χορηγήθηκαν σε σολομούς. Σε δείγματα αίματος σολομών μετρήθηκαν βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και τα αποτελέσματα της μέτρησης των δεικτών αυτών απέδειξαν την βελτιωμένη ικανότητα των οργανισμών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

Με την παρούσα διπλωματική εργασία ενισχύεται η ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία και γίνεται ακόμη πιο αντιληπτό ότι ένα παραπροϊόν της διαδικασίας της ελαιοτριβίσης μπορεί να χρησιμεύσει στη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως ακριβώς συμβαίνει και με υποπροϊόντα τυροκομίας και οινοποιίας. Η αξιοποίηση ενός τέτοιου, κατά τα άλλα περιβαλλοντικού ρύπου, καθιστά τη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου, μια πιο φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία και παράλληλα συμβάλλει στη μείωση του κόστους και ταυτόχρονα στη βελτίωση της ποιότητας των ζωοτροφών.

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agalias A. et al, A new process for the management of olive oil mill wastewater and recovery of natural antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(7): 2671–2676
- Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des.* 2001;7(10):933-50.
- Björnstedt M, Kumar S, Björkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci.* 1997 10(2-3): 271-9
- Boone CW, Kelloff GJ, Steele VE, Sharma S et al., Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis* 2000; 21: 63-67,
- Borja, R., Rincón, B. and Raposo, F. Anaerobic biodegradation of two-phase olive mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006; 81: 1450-1462
- Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res.* 1998; 28(6): 601-9
- Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Alarcón-de-la-Lastra C. An up-date of olive oil phenols in inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Curr Med Chem.* 2013; 20(37): 4758-76.
- Cardinali A, Cicco N, Linsalata V, Minervini F, Pati S, Pieralice M, Tursi N, Lattanzio V. Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(15): 8585-90.
- Cardinali A, Pati S, Minervini F, D'Antuono I, Linsalata V, Lattanzio V. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(7): 1822-9.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3): 527-605.
- Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016; 95: 27-42.

- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001; 53(1): 135-59.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324:1-18.
- Đuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010; 59(4): 459-469.
- Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.* 2001; 85 Suppl 2:S67-74.
- Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(22): 5179-88.
- Gerasopoulos K, Stagos D, Kokkas S, Petrotos K, Kantas D, Goulas P, Kouretas D. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem Toxicol.* 2015; 82: 42-9.
- Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Kokkas S, Kantas D, Goulas P, Kouretas D. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol.* 2015; 86: 319-27.
- Gerogianni I, Gourgoulíanis K.I. Oxidative stress and lung diseases, *Arch Hellen Med.* 2006; 23(5): 444-454.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P., Fenn W.O., Oxygen poisoning and xirradiation: a mechanism in common, *Science*, 1954; 119(3097): 623-6.
- Ghezzi P, Bonetto V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* 2003; 3(7): 1145-53.

- Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med.* 2002 15; 32(12): 1264-75.
- Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899: 1-14.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-28.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* 2007. 4th Edition, Oxford University Press, New York.
- Halliwell, B. *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease.* 2015 In eLS , John Wiley & Sons, Ltd (Ed.)
- Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact.* 2009; 180(3): 421-32.
- Harman D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11(3): 298-300
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., & Crowther, J. Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 2008; 7: 1-26.
- Kiritsakis A, Turcan KM, Kiritsakis M. Olive Oil. In: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sahidi F (ed) 2020; 2: 307-344.
- Kouka P, Tsakiri G, Tzortzi D, Dimopoulou S, Sarikaki G, Stathopoulos P, Veskoukis AS, Halabalaki M, Skaltsounis AL, Kouretas D. The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 20:1870965.

- Makri S, Kafantaris I, Savva S, Ntanou P et al., Novel feed including olive oil mill wastewater bioactive compounds enhanced the redox status of lambs. *In Vivo*. 2018; 32: 291-302.
- Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T et al., Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food Chem Toxicol*. 2017; 102:24-31.
- Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T, Petrotos K, Gerasopoulos K, Mpesios A, Goutzourelas N, Kokkas S, Goulas P, Komiotis D, Kouretas D. Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food Chem Toxicol*. 2017; 102: 24-31.
- Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L, Goya L, Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2010; 54: 956-966 .
- Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(10): 4360-4.
- Nakagami Y. Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 7469326.
- Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(2): 351-78.
- Papadopoulou A, Petrotos K, Stagos D, Gerasopoulos K, Maimaris A, Makris H, Kafantaris I, Makri S, Kerasioti E, Halabalaki M, Brieudes V, Ntasi G, Kokkas S, Tzimas P, Goulas P, Zakharenko AM, Golokhvast KS, Tsatsakis A, Kouretas D. Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8273160.

- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015 5; 97: 55-74.
- Reeves KG, Kanai Y. Electronic Excitation Dynamics in Liquid Water under Proton Irradiation. *Sci Rep.* 2017; 13: 7:40379.
- Rinaldi M, Rana G, Introna M. Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop, *Field Crops Res.* 2003; 84(3): 319-326
- Scoditti E, Capurso C, Capurso A, Massaro M. Vascular effects of the Mediterranean diet-part II: role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascul Pharmacol.* 2014; 63(3): 127-34.
- Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2004; 5(3): 237-45.
- Sies H. Oxidative stress. Academic Press. 1985, London
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2003 29; 531(1-2): 231-51.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
- Vaya J and Aviram M. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry.* 2001; 18: 99-117.
- Κουτσαντάκης Α., Θέματα Ορθής Παραλαβής σε Τριφασικό και Διφασικό Ελαιοτριβείο. Συνεταιριστική Ελαιουργική Α.Ε., 2008
- Κυριτσάκης Α., Ελαιόλαδο Συμβατικό & Βιολογικό, Βρώσιμη Ελιά – Πάστα Ελιάς, 2007

Μπλίκια Π. Βιοτεχνολογικές Μέθοδοι Επεξεργασίας Υγρών Απόβλητων Ελαιοτριβείου (Doctoral Dissertation), Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών (2009)

Παπαγαλάνης Ν., Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I, 2014

Φωτεινόπουλος Ι., Νταρακάς Ε., Διαχείριση Αποβλήτων Ελαιοτριβείων - Η Περίπτωση του Νομού Μεσσηνίας. Εργαστήριο Τεχνικής και Σχεδιασμού Περιβάλλοντος, Τομέας Υδραυλικής και Τεχνικής Περιβάλλοντος, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Πολυτεχνική Σχολή Α.Π.Θ. 2018)