



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ
(ΠΑΓΚΡΕΑΣ – ΣΤΟΜΑΧΟΣ - ΗΠΑΡ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ
ΧΟΙΡΙΔΙΑΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ.**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIG TISSUES
(PANCREAS – STOMACH- LIVER) IN ABLACTATION PERIOD TREATED
WITH POLYPHENOLIC ADDITIVES.**



ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Α. ΚΡΟΥΕΖΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Και στην αγαπημένη μου, Βιολέτα Γκινάλας,
για την συμπαράσταση και βοήθεια της.

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

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, για τη συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ/Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Γερασόπουλο που βοήθησε τα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, όσο και για την καθολική παρουσία του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος κάνοντας όλη την εμπειρία ακόμα πιο ευχάριστη. Ευχαριστώ ακόμη όλη την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου, για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για τους στόχους της παρούσας εργασίας εκτράφηκαν είκοσι (20) χοίριδια τα οποία διαχωρίστηκαν σε 2 ομάδες των δέκα (10). Σε αυτές τις δύο ομάδες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Στην πρώτη ομάδα η οποία αποτελούσε την ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε κανονικό σιτηρέσιο για χοίρους, ενώ το σιτηρέσιο της δεύτερης ομάδας περιείχε επιπλέον επεξεργασμένα Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ) τα οποία περιέχουν πολυφαινόλες. Στα αρχικά στάδια του πειράματος παρασκευάστηκε ενσίρωμα το οποίο περιείχε τα ΥΑΕ και στη συνέχεια προστέθηκε στο σιτηρέσιο των χοίρων που ανήκαν στην πολυφαινολική ομάδα. Τα χοίριδια εκτράφηκαν για 50 ημέρες και κατά τη διάρκεια έγιναν 4 ιστοληψίες - αιμοληψίες (2, 20, 35 και 50 ημέρες μετά την γέννηση). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ο ηπατικός, παγκρεατικός και στομαχικός ιστός από το σύνολο των 9 ιστών που ελήφθησαν. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να μελετηθεί εάν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των χοιριδίων σε νεαρή ηλικία.

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

ABSTRACT

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1. Πολυφαινόλες.....	13
1.1.1 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών.....	14
1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.....	14
1.1.3 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινολών.....	14
1.2. Οξειδωτικό Στρές.....	18
1.2.1 Ιστορική Αναδρομή	18
1.2.2 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂	19
1.2.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας	20
1.2.4 Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ) στον Οργανισμό μας	23
1.2.5 Επίδραση των Ελεφθέρων Ριζών στην Υγεία.....	24
1.3 Προστατευτικός Ρόλος των Πολυφαινολών από Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ)	25
1.3.1 Καρδιαγγειακό.....	25
1.3.2 Αντιμικροβιακή και Αντι-ϊική Δραστηριότητα.....	27
1.3.3 Καρκίνος.....	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1 Γενικά.....	29
2.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου.....	32
2.2.1 Εισαγωγή.....	32
2.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.....	35
2.2.3 Παρασκευή Πολυφαινολικού Σιτηρεσίου.....	35
2.3 Αιμοληψία - Ιστοληψία.....	39

2.3.1 Υλικά.....	39
2.4 Επεξεργασία Αίματος - Ομογενοποίηση Ιστών.....	40
2.4.1 Περιγραφή Μεθόδου.....	40
2.5 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.....	42
2.5.1 Γενικά.....	42
2.5.2 Μέθοδοι.....	42
A) GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	43
A1) Αρχή της Μεθόδου.....	43
A2) Αντιδραστήρια.....	44
A3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.....	44
A4) Υπολογισμοί.....	45
B) Δραστηριότητα της Καταλάσης.....	45
B1) Αρχή της Μεθόδου.....	45
B2) Αντιδραστήρια.....	46
B3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.....	47
B4) Υπολογισμοί	47
Γ) Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)	48
Γ1) Αρχή της Μεθόδου	48
Γ2) Αντιδραστήρια.....	49
Γ3) Πειραματικό πρωτόκολλο.....	49
Γ4) Υπολογισμοί.....	50
Δ) Ουσίες που Αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS).....	50
Δ1) Αρχή της μεθόδου.....	50
Δ2) Αντιδραστήρια.....	51
Δ3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.....	52
Δ4) Υπολογισμοί.....	52
E) Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	52
E1) Αρχή της Μεθόδου	52
E2) Αντιδραστήρια.....	53
E3) Πειραματικό Πρωτόκολλο	54
E4) Υπολογισμοί	55
2.6 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Ηπατικό, Παγκρεατικό και Στομαχικό Ιστό	55

2.6.1 GSH.....	55
2.6.2 Δραστηριότητα της Κατάληξης.....	56
2.6.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TotalAntioxidantCapacity, TAC)	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1. Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ.</i>	17
<i>Πίνακας 2. Μέσος Όρος Μέτρησης Βάρους των Χοιριδίων.</i>	31
<i>Πίνακας 3. Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας (B) με Πολυφαινολικά Πρόσθετα.</i>	36
<i>Πίνακας 4. Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας A (ελέγχου) (χωρίς πολυφαινόλες)</i>	38
<i>Πίνακας 5. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.</i>	44
<i>Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.</i>	47
<i>Πίνακας 7. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της TAC.</i>	49
<i>Πίνακας 8. Αύξηση GSH στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	57
<i>Πίνακας 9. Αύξηση GSH στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	58
<i>Πίνακας 10. Αύξηση GSH στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	58
<i>Πίνακας 11. Αύξηση Καταλάσης στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	59
<i>Πίνακας 12. Αύξηση Καταλάσης στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	59
<i>Πίνακας 13. Αύξηση Καταλάσης στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	60
<i>Πίνακας 14. Αύξηση TAC στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	60
<i>Πίνακας 15. Αύξηση TAC στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	61
<i>Πίνακας 16. Αύξηση TAC στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	61
<i>Πίνακας 17. Μείωση TBARS στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.</i>	62
<i>Πίνακας 18. Μείωση TBARS στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας</i>	62

σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.	
Πίνακας 19. Μείωση TBARS στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.	63
Πίνακας 20. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.	63
Πίνακας 21. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.	64
Πίνακας 22. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων.	14
Εικόνα 2. Βιολογικές Ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Cicerale et al., 2008).	16
Εικόνα 3. Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Νιαουμπάκης & Χαλβαδάκης, 2006)	17
Εικόνα 4. Συνέχεια από: Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Νιαουμπάκης & Χαλβαδάκης, 2006)	18
Εικόνα 5. Το DNA, οι Πρωτεΐνες και τα Λιπίδια, Αποτελούν τους Στόχους των Ελευθέρων Ριζών.	22
Εικόνα 6. Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.	22
Εικόνα 7. Κλινικές Καταστάσεις Με Τις Οποίες Έχει Βρεθεί Ότι Σχετίζονται Τα ROS (Lee et al., 2003).	24
Εικόνα 8. Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale et al., 2010).	25
Εικόνα 9. Προτεινόμενο μοντέλο για τους μηχανισμούς δράσης της του ελαϊκού οξέως και άλλων ενώσεων του ελαιολάδου, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία.	26
Εικόνα 10. Οι Χώροι Εγκατάστασης στις Οποίες Εκτράφηκαν οι Χοίροι που Συμμετείχαν στην Παρούσα Μελέτη.	29
Εικόνα 11. Ανάλυση Επεξεργασμένων ΥΑΕ (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Ένα Πέρασμα), με την HPLC μέθοδο.	36
Εικόνα 12. Ζυγαριά Ακριβείας Και Συσκευή Αποσυμπίεσης.	37

<i>Εικόνα 13. Αιμοληψία από Πρόσθια Κοίλη Φλέβα και Τοποθέτηση Αίματος σε Σωληνάκια Περισυλλογής.</i>	40
<i>Εικόνα 14. Διατήρηση Πλάσματος και Αιμολύματος σε Φιαλίδια Eppendorf</i>	41
<i>Εικόνα 15. Τα Εργαλεία που Χρησιμοποιήθηκαν για την Ομογενοποίηση Ιστών</i>	42
<i>Εικόνα 16. Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.</i>	43
<i>Εικόνα 17. Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.</i>	44
<i>Εικόνα 18. Μονοπάτι Αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O.</i>	46
<i>Εικόνα 19. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.</i>	51
<i>Εικόνα 20. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου</i>	53

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<i>Διάγραμμα 1. Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου από την Εικοστή Μέρα της Γέννησης Μέχρι την Πεντηκοστή.</i>	30
<i>Διάγραμμα 2. Αύξηση Στα Βάρη Των Χοίρων Σε Σχέση Με Το Χρόνο.</i>	31
<i>Διάγραμμα 3. Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων.</i>	39
<i>Διάγραμμα 4. Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης.</i>	55
<i>Διάγραμμα 5. GSH στον Ηπατικό Ιστό (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία).</i>	57
<i>Διάγραμμα 6. GSH στον Παγκρεατικό Ιστό.</i>	58
<i>Διάγραμμα 7. GSH στον Στομαχικό Ιστό.</i>	58
<i>Διάγραμμα 8. Καταλάση στο Ήπαρ (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία).</i>	59
<i>Διάγραμμα 9. Καταλάση στον Παγκρεατικό Ιστό.</i>	59
<i>Διάγραμμα 10. Καταλάση στον Στομαχικό Ιστό.</i>	60
<i>Διάγραμμα 11. TAC στον Ηπατικό Ιστό (*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control ανά ιστοληψία).</i>	60
<i>Διάγραμμα 12. TAC στον Παγκρεατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	61
<i>Διάγραμμα 13. TAC στον Στομαχικό Ιστό των Χοίρων.</i>	61

<i>Διάγραμμα 14. TBARS στο Ήπαρ των Χοίρων.</i>	62
<i>Διάγραμμα 15. TBARS στον Παγκρεατικό Ιστό των Χοίρων.</i>	62
<i>Διάγραμμα 16. TBARS στον Στομαχικό Ιστό των Χοίρων.</i>	63
<i>Διάγραμμα 17. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ηπατικό Ιστό.</i>	63
<i>Διάγραμμα 18. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Παγκρεατικό Ιστό.</i>	64
<i>Διάγραμμα 19. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Στομαχικό Ιστό.</i>	64
<i>Διάγραμμα 20. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 35 Ημερών).</i>	65
<i>Διάγραμμα 21. Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Αύξησης – Μείωσης των Δεικτών του Οξειδωτικού Στρες. (Ηλικία 50 Ημερών).</i>	65

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ενώσεις που απαντώνται στην φύση και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και τα ποτά. Τα φρούτα όπως τα σταφύλια, μήλα, αχλάδια, κεράσια και τα μούρα περιέχουν μέχρι 200-300 mg πολυφαινολών ανά 100 γραμμάρια νωπού βάρους. Τα προϊόντα που κατασκευάζονται από αυτά τα φρούτα, περιέχουν επίσης πολυφαινόλες σε σημαντικές ποσότητες.

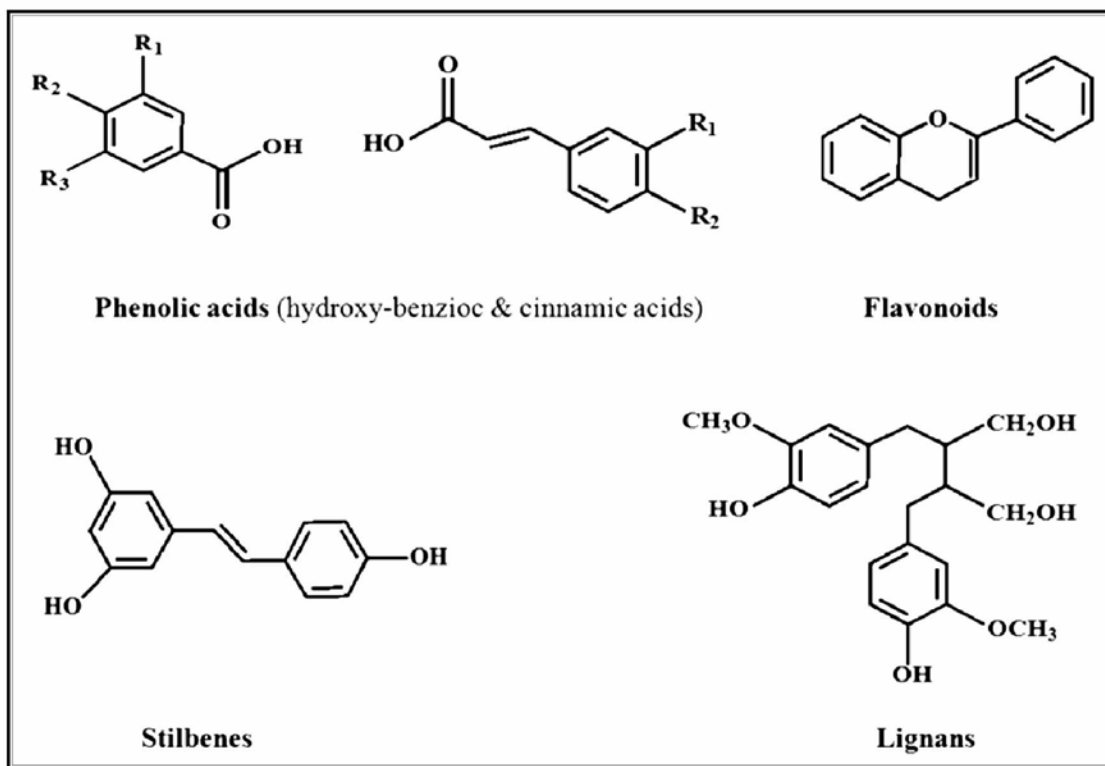
Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Προς το τέλος του 20ου αιώνα, διάφορες επιδημιολογικές μελέτες και αναλύσεις προτείνουν ότι η μακροχρόνια λήψη φυτικών πολυφαινολών μέσω της διατροφής, προσφέρει κάποια προστασία ενάντια στην ανάπτυξη του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη, της οστεοπόρωσης και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Πολυφαινόλες και άλλα φαινολικά συστατικά των τροφίμων αποτελούν αντικείμενο αυξημένου επιστημονικού ενδιαφέροντος, λόγω των πιθανών ευεργετικών επιδράσεών τους στην ανθρώπινη υγεία.

1.1.1 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών

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 προδρόμη ένωση, το σικιμικό οξύ. Κυρίως απαντώνται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα υπολείμματα σακχάρων που συνδέονται με υδροξυλομάδες, αν και υπάρχουν επίσης άμεσες συζευξεις του σακχάρου (πολυσακχαρίτη ή μονοσακχαρίτη) με έναν αρωματικό άνθρακα. Συσχέτιση με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και συνδεση με άλλες φαινόλες είναι επίσης κοινή. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων τα οποία δεσμεύουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες πολυφαινολών περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες.

Η διαφορετικότητα τους έγκειται στο υδροξυλικό τους πρότυπο και μπορεί να είναι γλυκοσυλιωμένες ή/και ακετυλιωμένες. Το μέγεθος τους ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η

φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους (Perez-Jimenez et al., 2010).



Εικόνα 1. Χημικές Δομές Διαφορετικών Πολυφαινολικών Τάξεων.

1.1.2 Φυσικές Ιδιότητες.

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

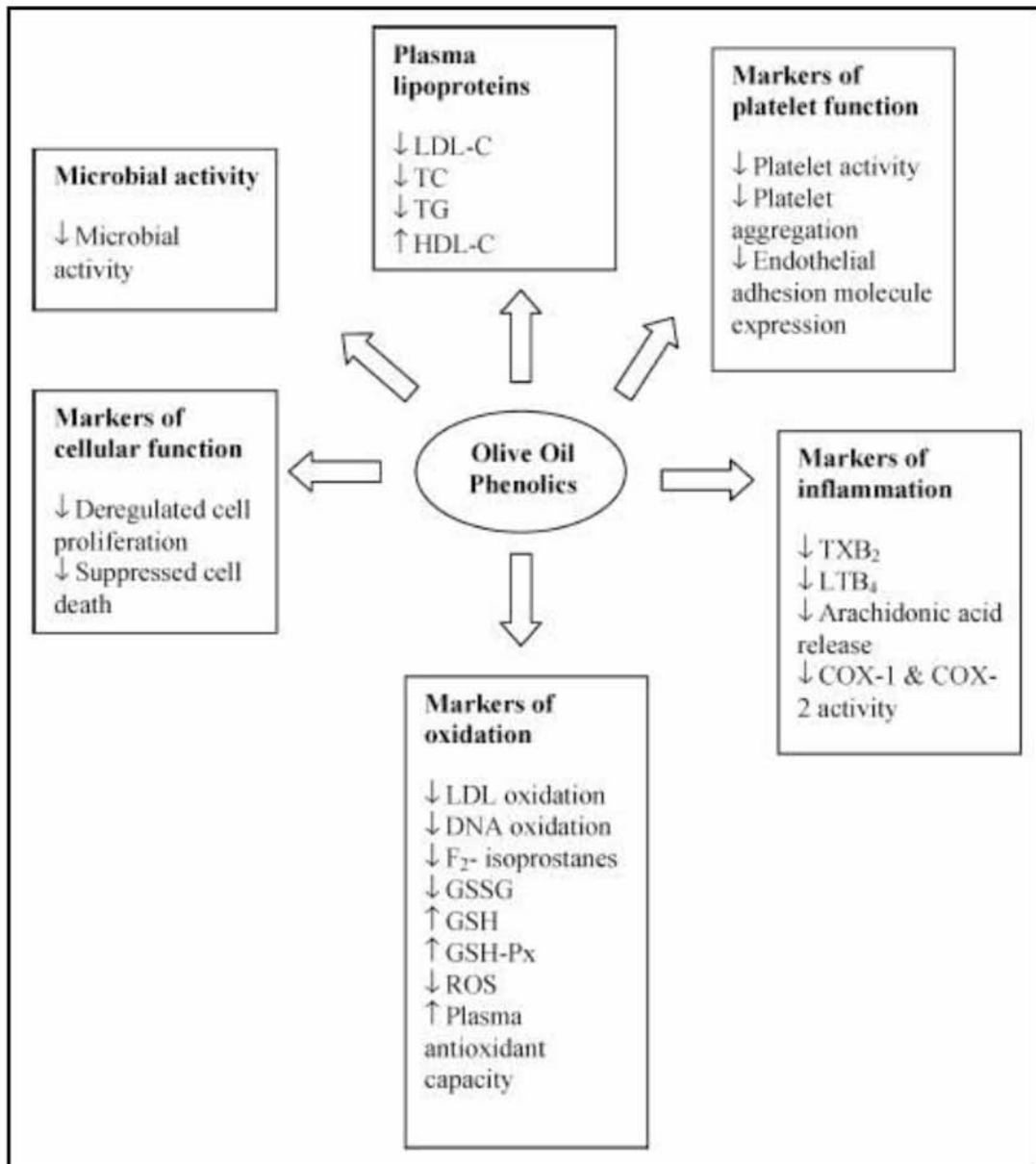
1.1.3 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινολών.

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

et al. 2013; Bidinotto *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2012; Arcidiacono *et al.*, 2012; Pauwels, 2010; LaVecchia, 2004; LaVecchia, 2009).

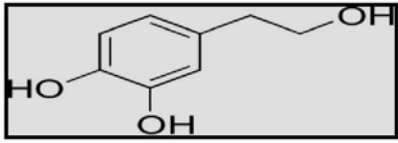
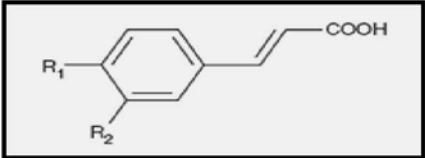
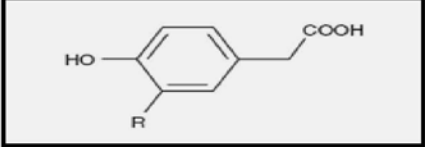
Η **χημειοπροστασία** ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον LeeWattenberg (20) και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Kushi *et al.*, 2011; Kiani *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2011; Baliga *et al.*, 2011; Brownell & Warner,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

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

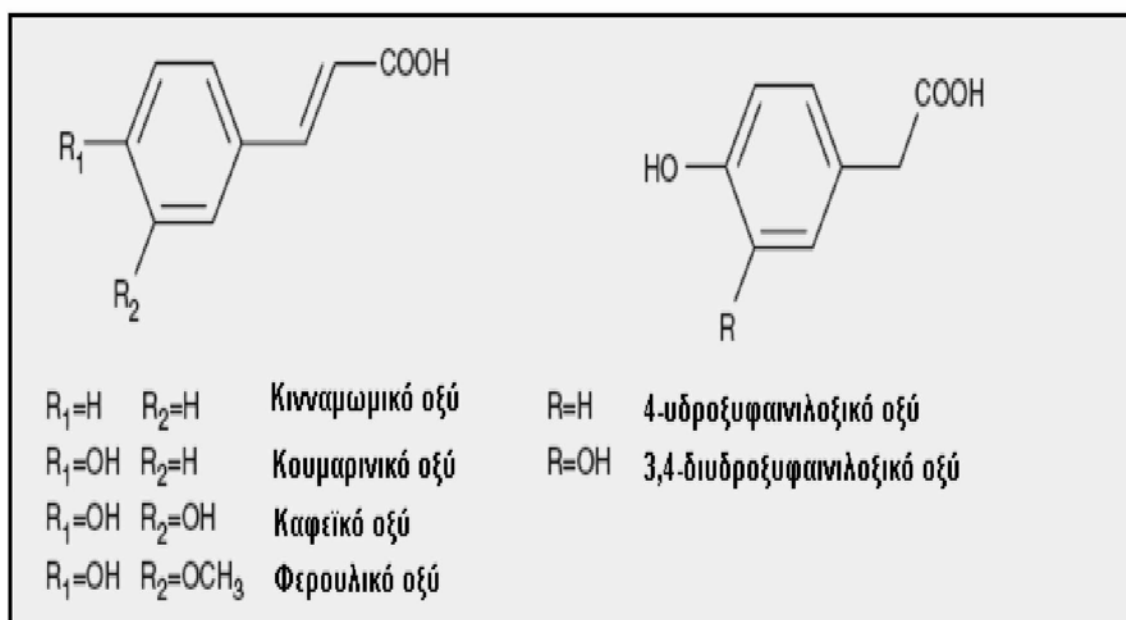


Εικόνα 2. Βιολογικές Ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Cicerale et al., 2008).

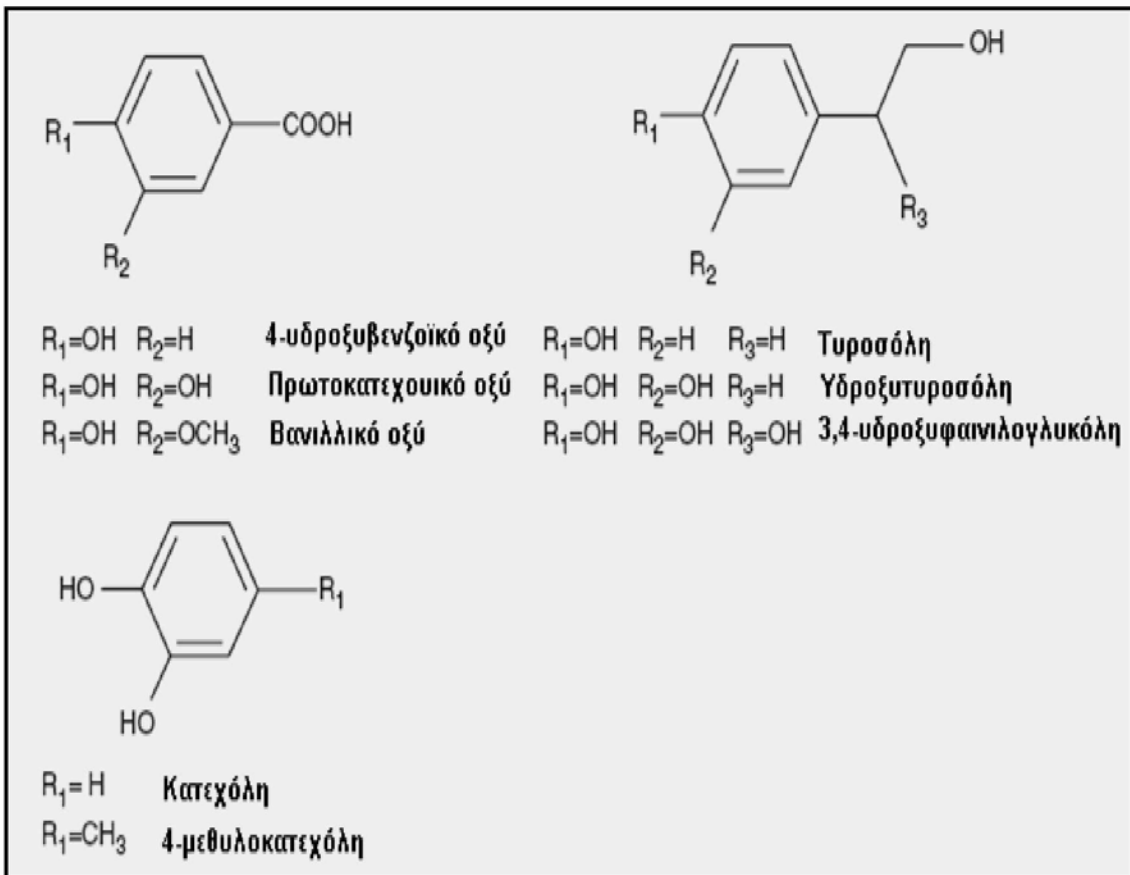
Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν τόσο ανάλογα με το είδος του φυτού, όσο και στα διάφορα μέρη του. Τα ΥΑΕ περιέχουν πολυφαινόλες, των οποίων οι κυριότερες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

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

Πίνακας 1. Κυριότερες Πολυφαινόλες στα ΥΑΕ.



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



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

1.2 Οξειδωτικό Στρες.

1.2.1 Ιστορική Αναδρομή.

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

Το O_2 είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των

αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2.2 Ελευθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O₂.

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

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

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

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

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.*, 2004; Pani & Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin *et al.*, 2009; Pani & Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*tripletstate*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singletstate*) και συμβολίζεται με $*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman *et al.*, 1993; Gutteridge, 1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil *et al.*, 2012; Vainio *et al.*, 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

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

1.2.3 Πως Δημιουργούνται οι Ελεύθερες Ρίζες στον Οργανισμό μας.

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται φυσιολογικά μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού, έχουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του κυττάρου και την προστασία του οργανισμού σε μολύνσεις (Pal *et al.*, 2010; Kiani *et al.*, 2005; Ibiebele *et al.*, 2013; Shim *et al.*, 2012; Niclis *et al.*, 2011; Lin & Cai, 2012; Cicerale *et al.*, 2008; Vainio *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2008). Όπως συμβαίνει σε καταστάσεις stress, οι ελεύθερες ρίζες αυξάνονται, προκαλώντας εκτεταμένες βλάβες στο γενετικό υλικό, σε πρωτεΐνες και σε λιπίδια (Lee *et al.*, 2005; Cicerale *et al.*, 2008; Battin *et al.*, 2009; Pani & Galeotti, 2010; Vainio *et al.*, 1999; Khalluki *et al.*, 2003). Av

αυτές οι βλάβες δε διορθωθούν από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που έχει το κύτταρο, προκαλούν σοβαρές επιπτώσεις στο κύτταρο (Kushi *et al.*, 2011; Kiani *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2011; Takata *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2012;)

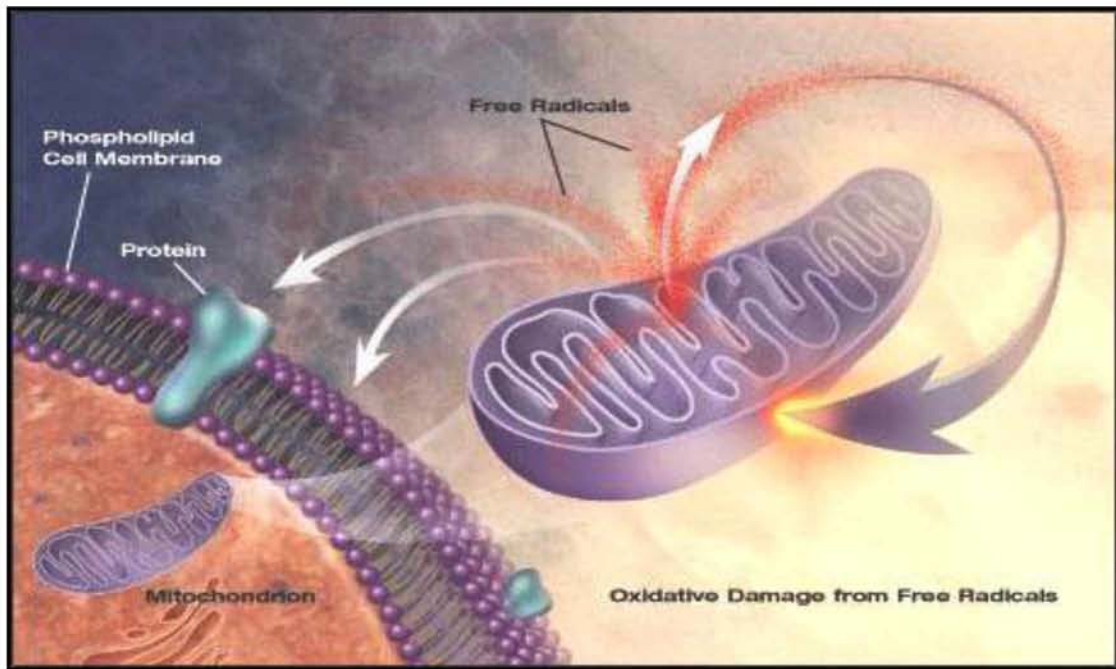
Οι κυριότεροι φυσιολογικοί μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντάς το σε σουπεροξείδιο (Battin *et al.*, 2009; Pani & Galeotti, 2010; Fujisawa *et al.*, 2004; Weisburger, 2001; AICR, 2007).

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

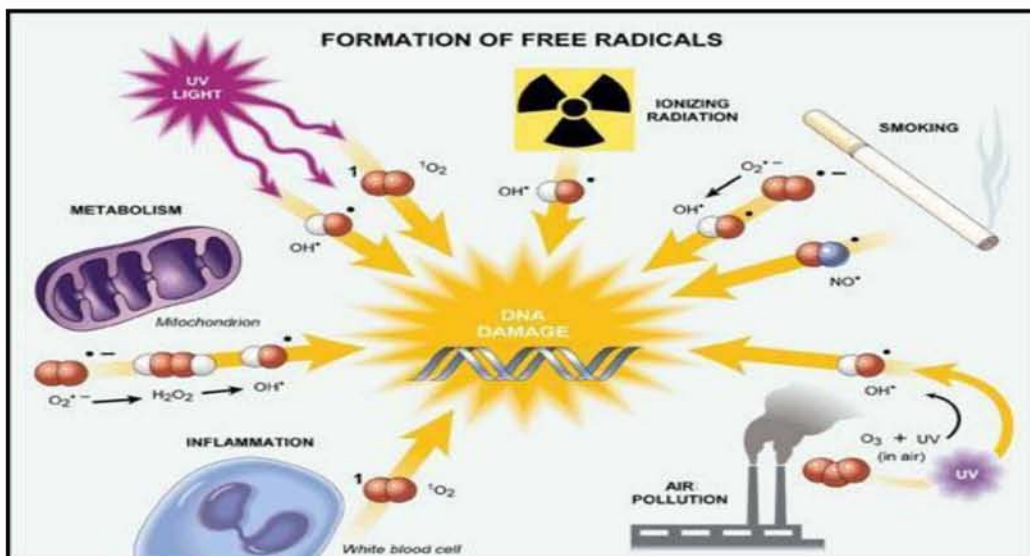
(γ) Την παραγωγή των ιδιαίτερων δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων (Pani & Galeotti, 2010; Battin *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2013; AICR, 2007).

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



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

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



Εικόνα 6. Τρόποι Σχηματισμού των Ελευθέρων Ριζών.

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

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

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

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

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

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

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

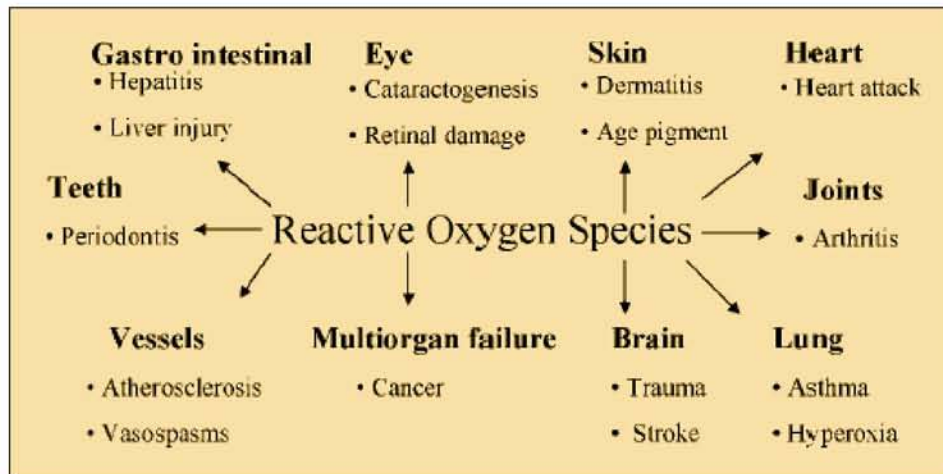
Το οξειδωτικό στρες **προκαλείται** συνήθως από:

- Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

1.2.5. Επίδραση των Ελευθέρων Ριζών στην Υγεία.

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

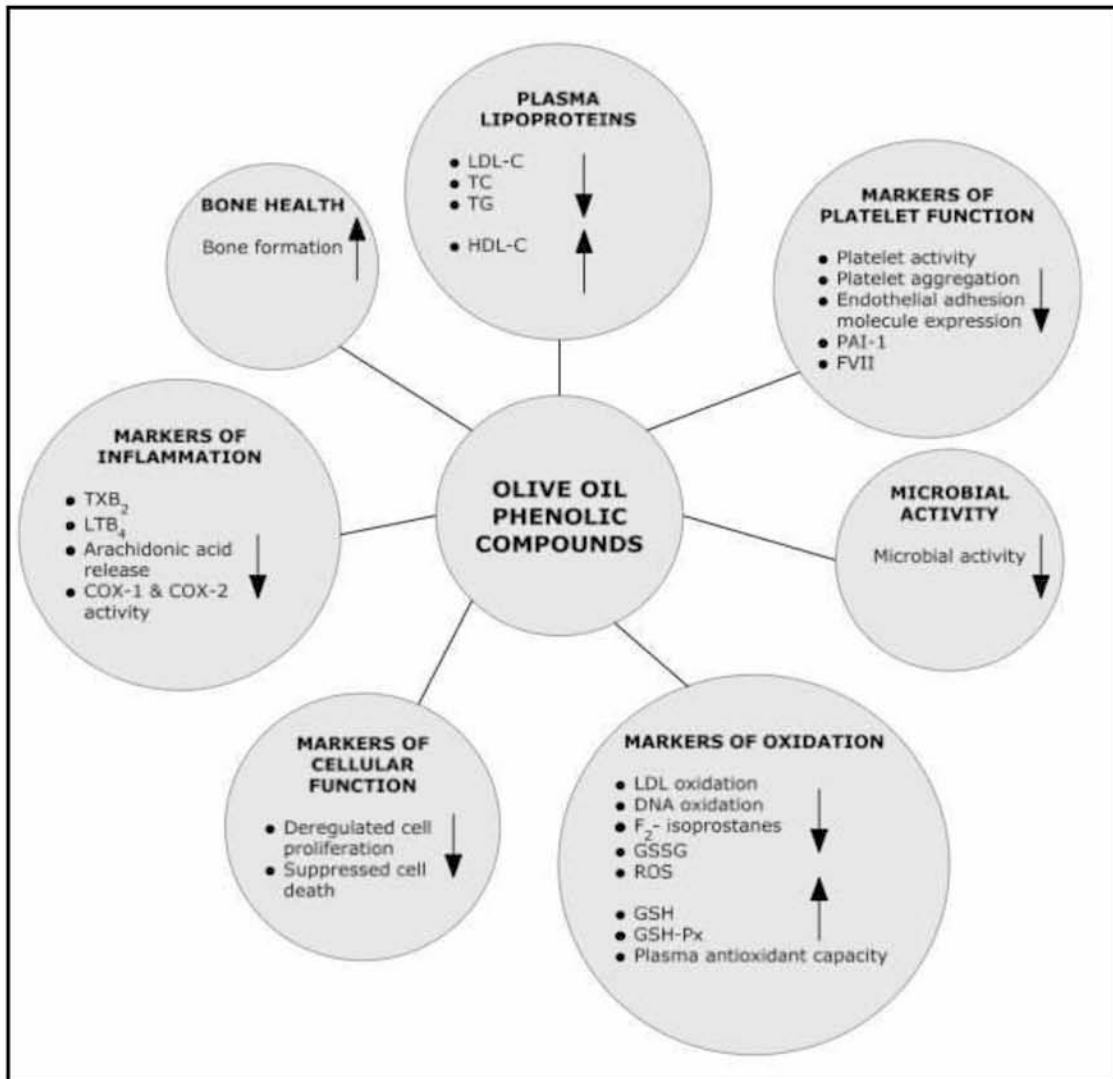
Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε, οι ελεύθερες ρίζες ευθύνονται για την πρόκληση και εμφάνιση πολλών ασθενειών, με το κατάλογο αυτών συνεχώς να αυξάνεται (Haliwell, 2001).



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

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

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



Εικόνα 8. Αποτελεσματικότητα των Πολυφαινολικών Συστατικών του Ελαιολάδου σε Βιοδείκτες της Ανθρώπινης Υγείας. (Cicerale *et.al.*, 2010).

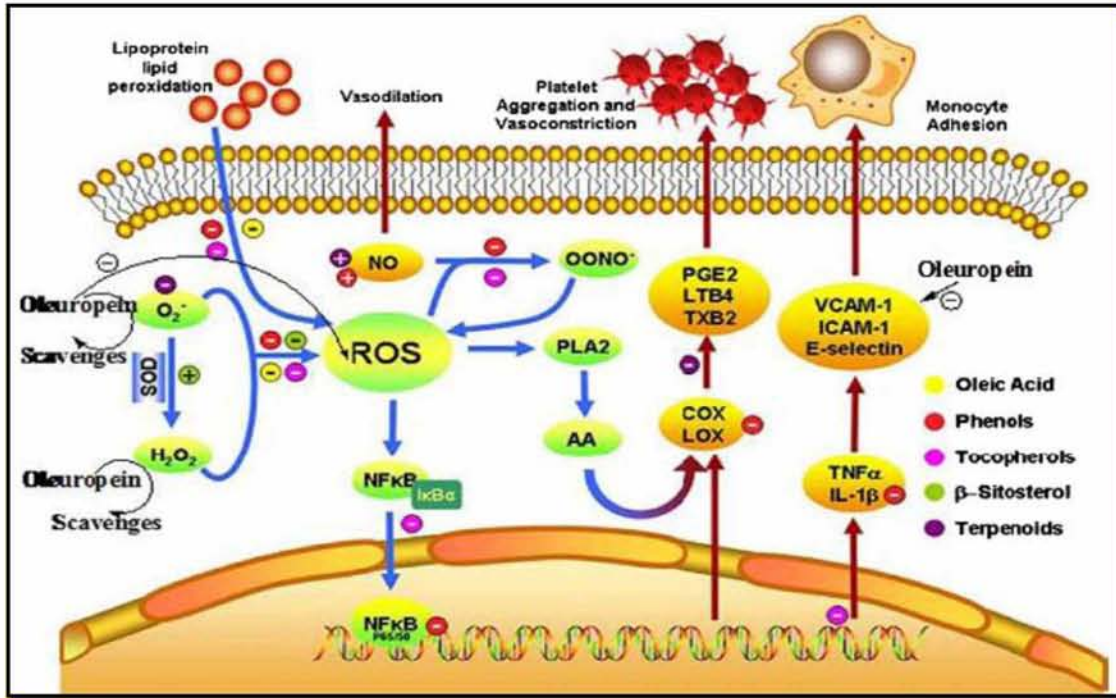
Παρακάτω, οι μελέτες παρουσιάζονται ανάλογα με την συγκεκριμένη – στοχευμένη βιοδραστικότητα.

1.3.1 Καρδιαγγειακό.

1) Τα αποτελέσματα μιας μελέτης της επίδρασης των πολυφαινολών του ελαιολάδου, στα αντισώματα, κατά της οξειδωμένης LDL - *LowDensityLipoprotein*, έδειξαν ότι οι

πολυφαινόλες του ελαιολάδου, προωθούν την δημιουργία OLAB (OxLDL autoantibodies – Αυτοαντισώματα της οξειδωμένης LDL). Καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, σε υψηλές συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL.(OlgaCastaner, et. al., 2011).

2) Καρδιοπροστατευτικός και νευροπροστατευτικός ρόλος της ελευρωπαΐνης στο ελαιόλαδο. (SyedHarisOmar. 2010).



Εικόνα 9. Προτεινόμενο μοντέλoγια τους μηχανισμούςδράσηςτης του ελαιϊκού οξέωςκαι άλλων ενώσεων του ελαιολάδου,με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2. Αντιμικροβιακή και Αντι-ιϊκή Δραστηριότητα.

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

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

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

1.3.3. Καρκίνος.

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

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

Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, έχει εξετάσει πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν (Stagos et. al., 2012). Τα περισσότερα

εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos et al., 2007, Spanou et al. 2007), με αποτέλεσμα αυτά τα εκχυλίσματα να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Τέλος, επηρέαζαν τη δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou et al., 2012; Spanou et al., 2008).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά.

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

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

Στις 2 Απριλίου 2014 γεννήθηκαν είκοσι (20) χοίροι από δύο (2) χοιρομητέρες (10 από την κάθε χοιρομητέρα). Το γενετικό υπόβαθρο των χοιρομητέρων προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X LargeWhite – Duroc – Pietrain (πατέρας).



Εικόνα 10. Οι Χώροι Εγκατάστασης στις Οποίες Εκτράφηκαν οι Χοίροι που Συμμετείχαν στην Παρούσα Μελέτη.

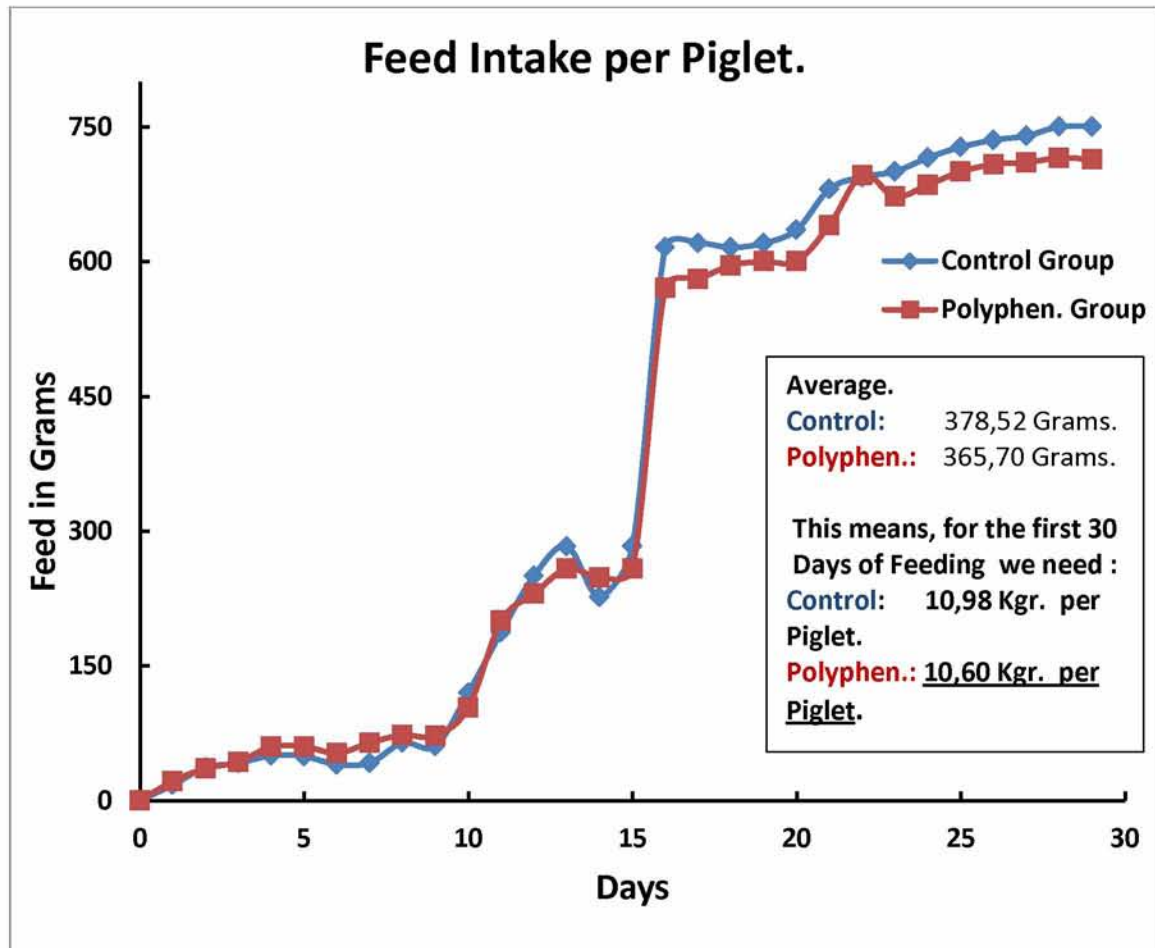
Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

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

Είκοσι (20) ημέρες από την γέννησή τους, ξεκίνησε ο απογαλακτισμός τους και τα δέκαξι (16) εναπομείναντα χοιρίδια, χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, εκ των οποίων οκτώ (8) αποτέλεσαν την ομάδα Α (ελέγχου) και τα άλλα οκτώ (8) την ομάδα Β, όπου στο σιτηρέσιό της υπήρχαν πολυφαινολικά πρόσθετα.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του απογαλακτισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους σε διαφορετικά κελιά για

χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη βδομάδα του απογαλακτισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες. Η απομάκρυνση των χοιρομητέρων έγινε 35 μέρες μετά την γέννηση τους. Συγχρόνως, όλες αυτές τις μέρες γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια απογαλακτισμού, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1.



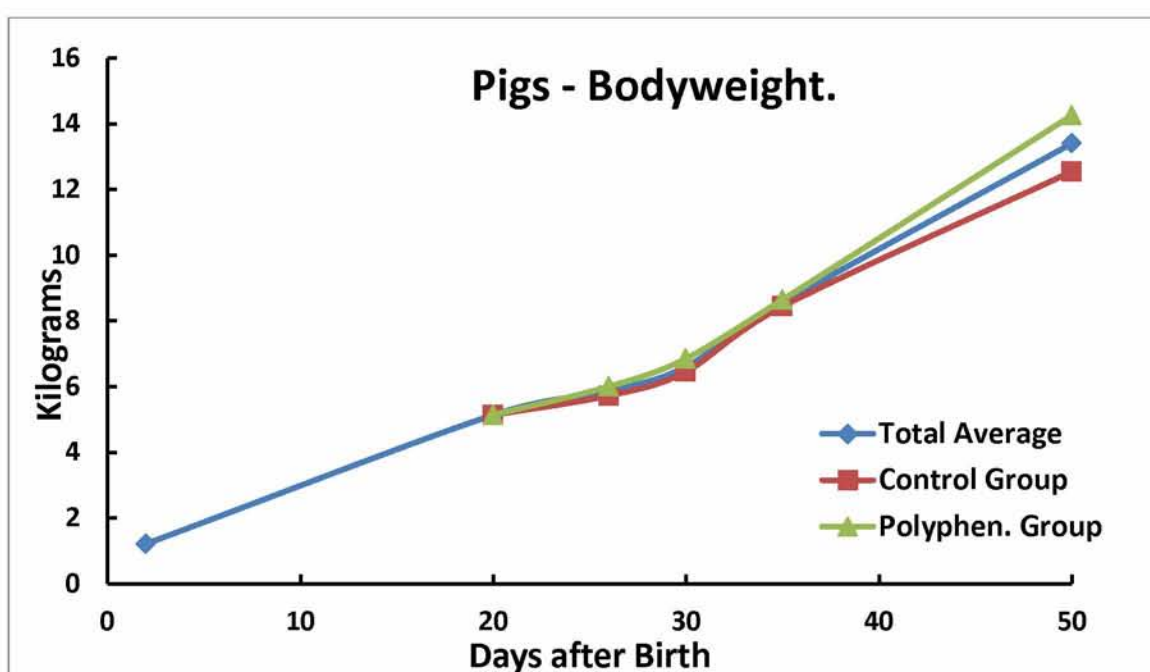
Διάγραμμα 1. Ημερήσια Κατανάλωση Σιτηρεσίου από την Εικοστή Μέρα της Γέννησης Μέχρι την Πεντηκοστή.

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

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

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

Πίνακας 2. Μέσος Όρος Μέτρησης Βάρους των Χοιριδίων.



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

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

- Εκτέλεση τεσσάρων (4) ιστοληψιών (σε 2, 20, 35 και 50 ημέρες μετά την γέννησή τους) 9 διαφορετικών ιστών στο Μικροσφαγείο που υπάρχει στο αγρόκτημα του ΤΕΙ/Θεσσαλίας. Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που

πάρθηκαν από τον παγκρεατικό, ηπατικό και στομαχικό ιστό. Τα αποτελέσματα των υπόλοιπων ιστών θα παρουσιαστούν σε επόμενες εργασίες.

Η πρώτη ιστοληψία εκτελέστηκε σε δύο (2) χοιρίδια ηλικίας δύο (2) ημερών και βάρους 0,950 και 1,560 kg. Χρησιμοποιήθηκε το αναισθητικό φάρμακο Xyloran® (Vetoquinol S.A., France) για να διασφαλιστεί ότι προκαλείται ο ελάχιστος δυνατός αναπόφευκτος πόνος, ταλαιπωρία ή αγωνία (Οδηγίες 2010/63/EE) και η θανάτωση έγινε στην εγκατάσταση του εκτροφέα από αρμόδιο, εκπαιδευμένο πρόσωπο. Η δεύτερη ιστοληψία έγινε είκοσι (20) μέρες μετά την γέννηση σε δύο (2) χοιρίδια ημερών και βάρους 4,900 και 4,550 kg. Η τρίτη ιστοληψία πραγματοποιήθηκε τριάντα πέντε (35) μέρες από τη γέννηση τους σε τέσσερα (4) χοιρίδια, 2 από το πολυφαινολικό group και 2 από το group των control. Η τέταρτη ιστοληψία έγινε πενήντα (50) μέρες από τη γέννηση τους σε δώδεκα (12) χοιρίδια, 6 από το πολυφαινολικό group και 6 από το group των control.

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

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

2.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου.

2.2.1 Εισαγωγή

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

Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου έπρεπε αρχικά να παρασκευαστεί ενσιρωμένο καλαμπόκι. Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του

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

Τα επιθυμητά βακτήρια είναι αυτά που μπορούν να μετατρέψουν υδατανθράκες σε γαλακτικό οξύ και είναι συνήθως στελέχη των βακτηρίων του *Lactobacillus* και *Streptococcus* . Είναι αναερόβια βακτήρια και πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια είναι ταχύτερη με την κοπή του χόρτου και την ταχεία εδραίωση του αποκλεισμού του αέρα . Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ και η γρήγορη παραγωγή του στο ενσιρωμένο χόρτο οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και σε συνθήκες οι οποίες θα παρεμποδίζουν την παραγωγή βακτηρίων που παράγουν γαλακτικό οξύ και πολλών ακόμα βακτηρίων .

Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως μία διεργασία καθαρισμού και το pH το οποίο προκύπτει εξαρτάται από την περιεκτικότητα της τροφής σε υγρασία. Αν η τροφή περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας τότε το pH πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό και να παραχθεί πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος.

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

Φάση 1^η: Αερόβια Φάση

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

Φάση 2^η: Φάση Ζύμωσης

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

Φάση 3^η: Σταθερή Φάση

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

Φάση 4^η : Αερόβια Φάση Αλλοίωσης

Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ενσιρώματος στην τροφή των ζώων αυτό είναι αναπόφευκτο, αλλά μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει νωρίτερα λόγω βλάβης του καλύμματος αποθήκευσης του ενσιρώματος. Η διαδικασία της αλλοίωσης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια. Η έναρξη της φθοράς μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση των οργανικών οξέων, που συμβάλλουν στην διατήρηση, από ζύμες και περιστασιακά βακτήρια οξικού οξέος. Αυτό θα προκαλέσει μια αύξηση στο pH, και ως εκ τούτου το δεύτερο στάδιο της αλλοίωσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης όπως βάκιλλοι, έχει ξεκινήσει. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επίσης τη δραστηριότητα πολλών άλλων (προαιρετικά) αερόβιων μικροοργανισμών, όπως μύκητες και εντεροβακτήρια. Αερόβια αλλοίωση συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις αποθηκεύσεις που έχουν ανοιχτεί και εκτίθενται στον αέρα. Ωστόσο, το ποσοστό της αλλοίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό και την δραστηριότητα των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο ενσίρωμα.

Η είσοδος του αέρα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή ακόμη και να εμποδίσει την επίτευξη σωστών επιπέδων pH. Αυτό θα οδηγήσει σε υπερβολική χρήση μεγάλων ποσοτήτων υδατανθράκων η οποία θα μειώσει την αξία θρεπτική αξία της 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 περαιτέρω μείωση των υδατανθράκων. Αυτό θα μικρύνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

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

2.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.

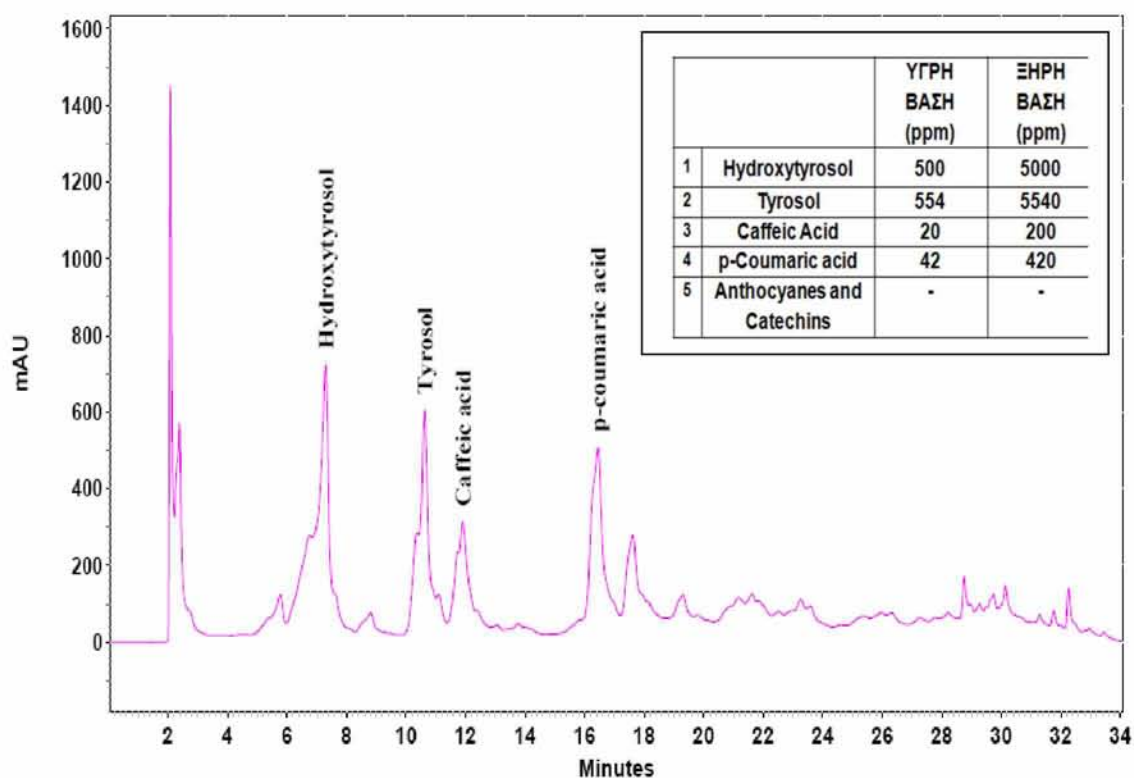
Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σ'ακχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1

2.2.3 Παρασκευή Πολυφαινολικού Σιτηρεσίου

Για την παρασκευή του πολυφαινολικού σιτηρεσίου χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια του γένους *Lactobacillus* τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ. Για την καλλιέργεια των βακτηρίων αρχικά ζυγίζονταν 1 gr βακτηρίων για κάθε 100 κιλά τελικού ενσιρωμένου προϊόντος. Τα βακτήρια αυτά στην συνέχεια έπρεπε να διαλυθούν μέσω ανάδευσης και θέρμανσης στους 40°C σε αναλογία 1/10 W/V. Δηλαδή το 1 gr βακτηρίων διαλύονταν σε 10 ml νερού. Το τελικό προϊόν ενσιρωμένου καλαμποκιού που θα προστεθεί στο σιτηρέσιο των γουρουνιών, τα οποία θα αποτελούν την ομάδα με τις πολυφαινόλες, θα περιέχει τα συστατικά που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

POLYPHENOL. GROUP.	
ΤΡΟΦΕΣ	%
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ (Ενσιρωμένο με κατακράτημα επεξεργασμένων ΥΑΕ, που προήλθε από μικροδιήθηση με κεραμικά φίλτρα, πολυφαινολοποιημένο με 4% στερεά + Καλαμπόκι με 56% στερεά). Σύνολο 60% Στερεά.	46,5
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21,0
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	20,0
ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ (PROVET)	10,0
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ (Piglets Corn 2,5%)	2,5
ΣΥΝΟΛΟ	100,0

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



Εικόνα 11. Ανάλυση Επεξεργασμένων ΥΑΕ (Συμπύκνωση με Αντλία Κενού, με Ένα Πέρασμα), με την HPLC μέθοδο.

Για την δημιουργία 100 κιλών ενσίρωματος προστέθηκαν 44 κιλά από επεξεργασμένα ΥΑΕ, τα οποία περιείχαν μέσα τις πολυφαινόλες και είχαν 4% στερεά. Επίσης ζυγίστηκαν 56 κιλά καλαμποκιού. Στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου προστέθηκε 1ml από την καλλιέργεια των βακτηρίων και αναμίχθηκαν. Στο αλεσμένο καλαμπόκι προστέθηκαν τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και αναμίχθηκαν. Στη συνέχεια το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε ειδικές σακούλες, του ενός κιλού, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν αεροστεγώς. **Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκαν 300 κιλά ενσίρωματος.**



Εικόνα 12. Ζυγαριά Ακρίβειας Και Συσκευή Αποσυμπίεσης.

Μετά το πέρας 2-4 ημερών (ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος), ήταν αναγκαίο οι σακούλες να ανοίγονται και να κλείνουν ξανά αεροστεγώς. Αυτή η διαδικασία που εκτελέστηκε τέσσερις (4) φορές, είναι απαραίτητη λόγω του ότι παράγεται διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης που πραγματοποιούν τα βακτήρια, με αποτέλεσμα αν δεν αφαιρεθεί ο αέρας οι σακούλες να ανοίξουν και να έρθουν σε επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Λόγω του ότι η αντίδραση που πραγματοποιείται για την ενσίρωση του καλαμποκιού απαιτεί αναερόβιες συνθήκες, η επαφή του ενσίρωματος με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης.

Κατά την διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας λαμβάνονταν δείγματα έτσι ώστε να γίνεται ο έλεγχος του pH του ενσίρωματος. Το pH το οποίο πρέπει να έχει το τελικό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο του 4,1. Επίσης το τελικό προϊόν της ενσίρωσης έχει πιο σκούρο χρώμα από το αρχικό και τα βακτήρια σταματούν την αντίδραση με

αποτέλεσμα να μην παρατηρείται ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα μέσα στην σακούλα που βρίσκεται το τελικό προϊόν.

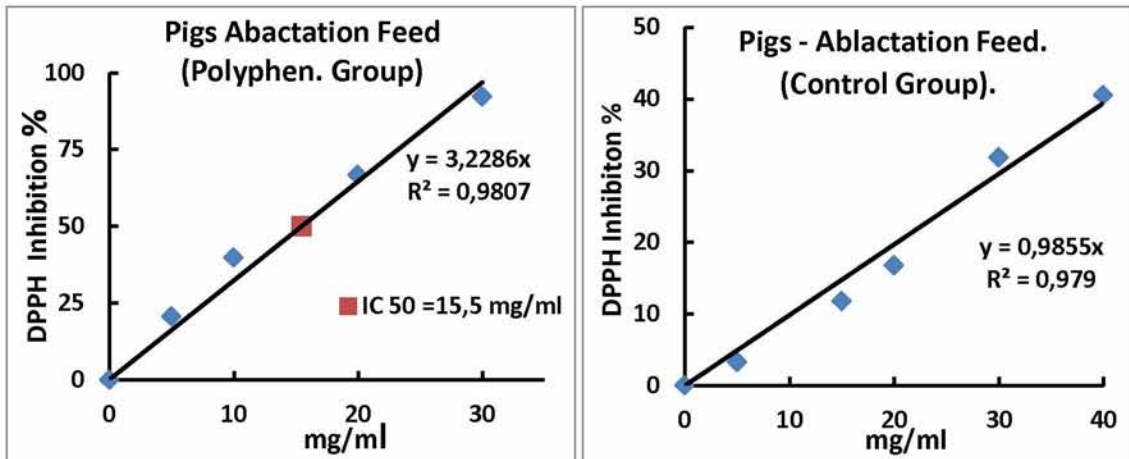
Η μέτρηση του pH έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστίθενται 9 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται έντονα σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν 3,95. Με την δεύτερη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστίθενται 5 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και τέλος μετρήθηκε το pH. Το pH του ενσιρώματος με την δεύτερη μέθοδο ήταν 3,97. Όπως φαίνεται και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες τιμές pH και συνεπώς το ενσίρωμά μας είχε ολοκληρωθεί η γαλακτική ζύμωση και ήταν πλέον έτοιμο για να προστεθεί στο σιτηρέσιο.

Μετά την επιτυχή παρασκευή του ενσιρώματος παρασκευάστηκε το σιτηρέσιο με το οποίο θα τρέφονταν τα γουρούνια της ομάδας B (σιτηρέσιο με πολυφαινόλες). Το σιτηρέσιο της ομάδας B παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα 3 και συσκευάστηκε κλεισμένο αεροστεγώς σε ειδικές σακούλες των 2 κιλών. Το σιτηρέσιο της ομάδας A (σιτηρέσιο χωρίς πολυφαινόλες) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

CONTROL GROUP	
ΤΡΟΦΕΣ	%
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	46,5
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21,0
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	20,0
ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ (PROVET)	10,0
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ (Piglets Corn 2,5%)	2,5
ΣΥΝΟΛΟ	100,0

Πίνακας 4. Σιτηρέσιο Απογαλακτισμού, ομάδας A (ελέγχου) (χωρίς πολυφαινόλες).

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



Διάγραμμα 3. Αντιοξειδωτική Δράση Σιτηρεσίων.

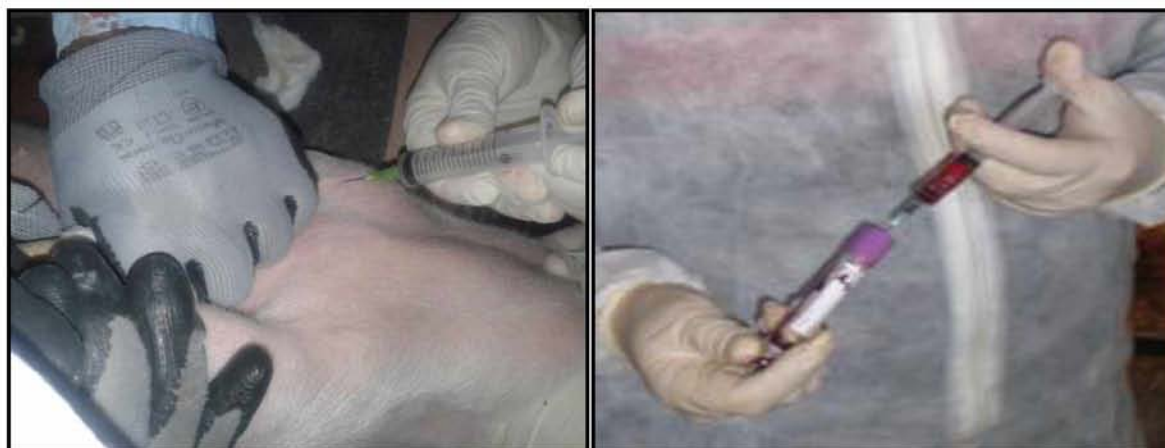
Παρατηρείται ότι ενώ στο σιτηρέσιο της ομάδας ελέγχου ακόμα και στα 40mg/ml η αναστολή της ρίζας είναι στα 40,52%, στο σιτηρέσιο της ομάδας με τα πολυφαινολικά πρόσθετα το IC₅₀ της ρίζας επιτυγχάνεται στα 15,5 mg/ml. Αυτό σημαίνει ότι το σιτηρέσιο της ομάδας που καταναλώνει τα πολυφαινολικά πρόσθετα εμφανίζει περίπου τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση από αυτό της ομάδας ελέγχου.

2.3 Αιμοληψία - Ιστοληψία.

Εκτελέστηκαν τέσσερις (4) αιμοληψίες-ιστοληψίες ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται από τους FramstadT. etal. (1988), όταν τα χοιρίδια ήταν ηλικίας 2, 20,35 και 50 ημερών, τα οποία καταλάωναν τα σιτηρέσια που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν (ομάδα ελέγχου ή πολυφαινολών).

2.3.1Υλικά:

- Μιας χρήσεως σύριγγες με βελόνα (PentaFerte®), χωρητικότητας 5 ml, που μετά τη χρήση τους απομακρύνονταν σε δοχεία περισυλλογής αιχμηρών αντικειμένων.
- Μιας χρήσεως αποστειρωμένα σωληνάρια συλλογής αίματος, (BDVacutainer® EDTATubes, με Ref. nr. 3668860), που περιείχαν 7,2 mg K3E. Το αντιπηκτικό EDTA(αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα μεχλιώση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.



Εικόνα 13. Αιμοληψία από Πρόσθια Κοίλη Φλέβα και Τοποθέτηση Αίματος σε Σωληνάκια Περισυλλογής.

Το αίμα από τα χοιρίδια λαμβάνονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα, αφού έχει προηγηθεί αναισθησία και θανάτωση σύμφωνα με τους κανονισμούς περί θανάτωσης εργαστηριακών ζώων που αναφέρονται στις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ.

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

2.4. Επεξεργασία Αίματος - Ομογενοποίηση Ιστών.

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

2.4.1 Περιγραφή Μεθόδου.

1. Τοποθετούμε τα σωληνάκια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.

4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L).
6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.



Εικόνα 14. Διατήρηση Πλάσματος και Αιμόλυματος σε Φιαλίδια Eppendorf.

Στη συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

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

Η μεταφορά των ιστών έγινε σε erpendorftubes των 2 ml σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση των ιστών (ηπατικός, παγκρεατικός και στομαχικός), εκτελέστηκε με γουδί και γουδοχέρικαι διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.

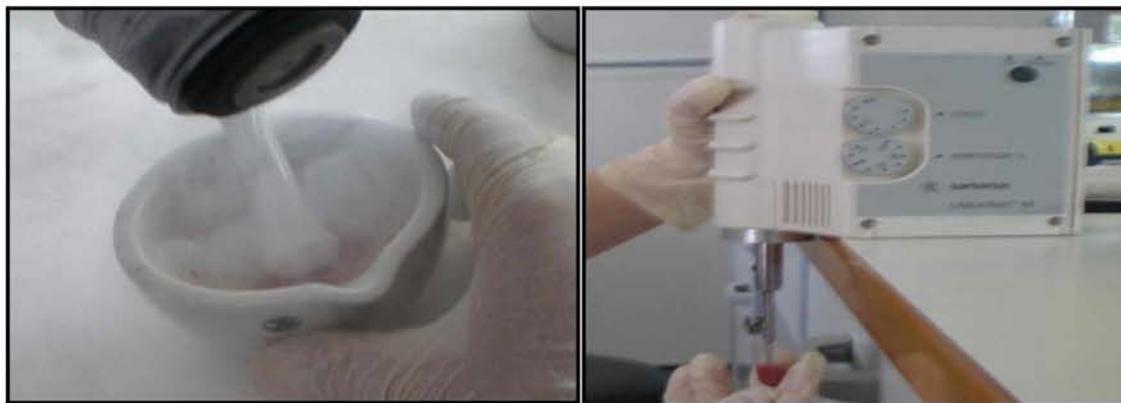
Ο ιστοί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCL, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH), όπως:

- Απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.

- Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη.

- PMSF (9mg/mL), κλπ.

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



Εικόνα 15. Τα Εργαλεία που Χρησιμοποιήθηκαν για την Ομογενοποίηση Ιστών.

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

2.5. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.

2.5.1. Γενικά.

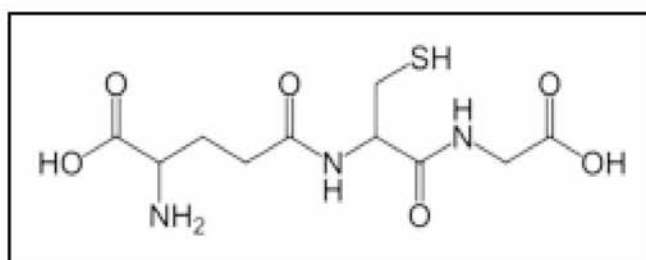
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστικότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Για την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

2.5.2. Μέθοδοι.

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

A) GSH στο Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα.

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστείνιογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM (186). Είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).

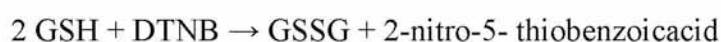


Εικόνα 16. Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.

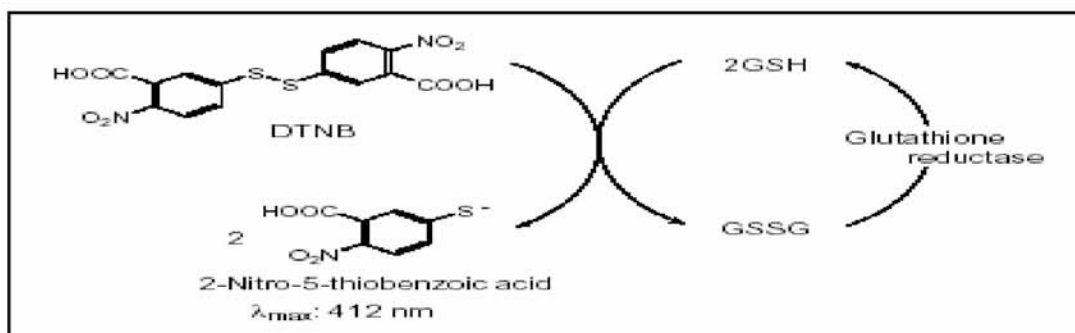
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinet al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων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

A1) Αρχή της Μεθόδου.

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



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



Εικόνα 17. Ανακόκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

A2) 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 phosphatebuffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

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

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

A3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

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

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της

αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Beers & Sizer, 1952)

A4) Υπολογισμοί.

Δραστηκότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) x 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραιώση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 x 1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση (390 μL / 300 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

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

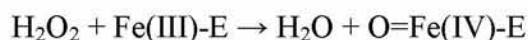
B) Δραστηριότητα της Καταλάσης.

B1) Αρχή της Μεθόδου.

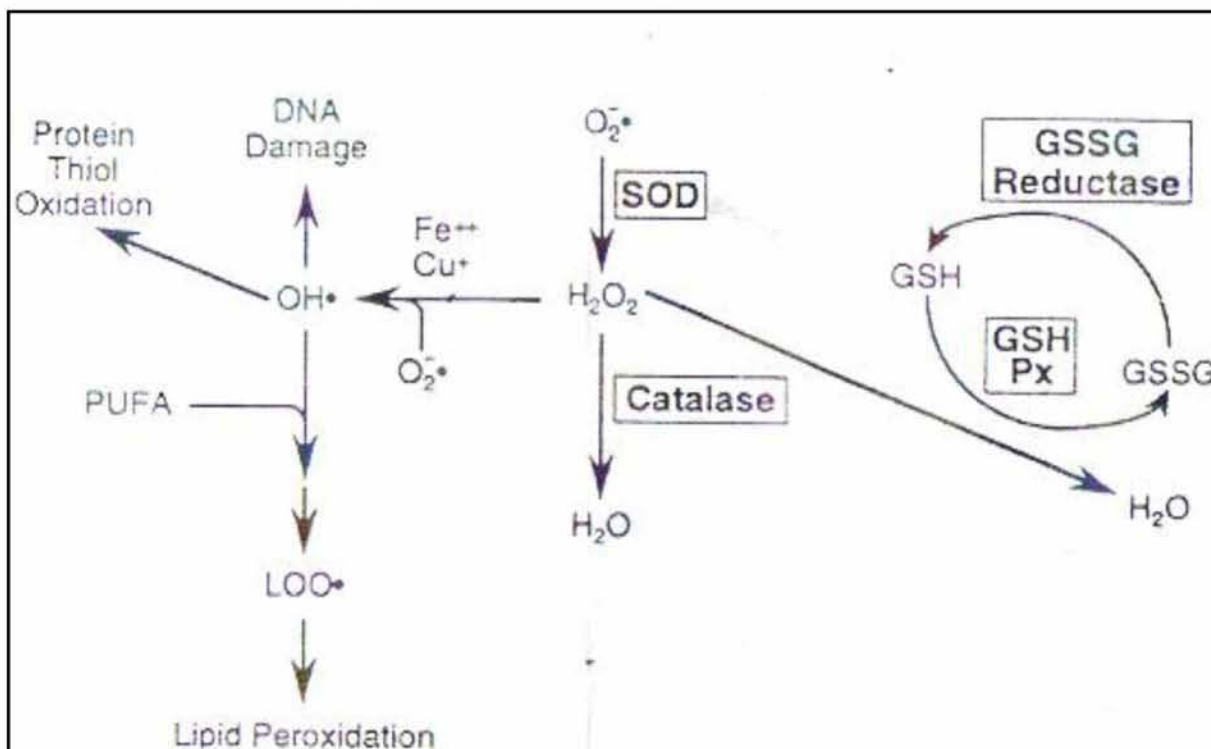
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H₂O₂ 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 et. al., 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂.

Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη: 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 18. Μονοπάτι Αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O.

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

CAT



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

Β) Αντιδραστήρια.

- **Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)** MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα

διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).** Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

B3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

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

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

B4) Υπολογισμοί.

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mgHb) = ($\Delta Abs_{\text{sample}} / \text{permin}$ / 40) x (750 x 1000 x 10 x 2) / Conc. Hb (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε

g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

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

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

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

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

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

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

Γ1) Αρχή της Μεθόδου

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

Γ2)Αντιδραστήρια.

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

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

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

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

Γ3)Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

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

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

Γ4)Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

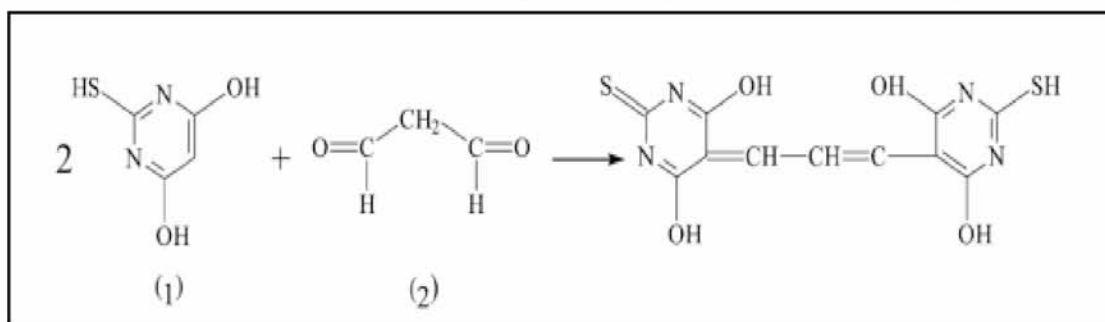
Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{molDPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος}$ ή $0.5 \text{ mmolDPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή 0.5 mmolDPPH/L .

Δ) Ουσίες που Αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Δ1) Αρχή της Μεθόδου.

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό 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. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της

μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



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

Δ2) Αντιδραστήρια.

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

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

- **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na₂SO₄): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 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 gTCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Δ3) Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L πλάσματος (για τα δείγματα) ή αποσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μ LTCA 35% και 500 μ LTris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mLNa₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °Cγια 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mLTCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε erpendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μ L από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Δ4) Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (μ mol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μ L) με τον όγκο του πλάσματος (100 μ L) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/Lto μ mol/L.

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

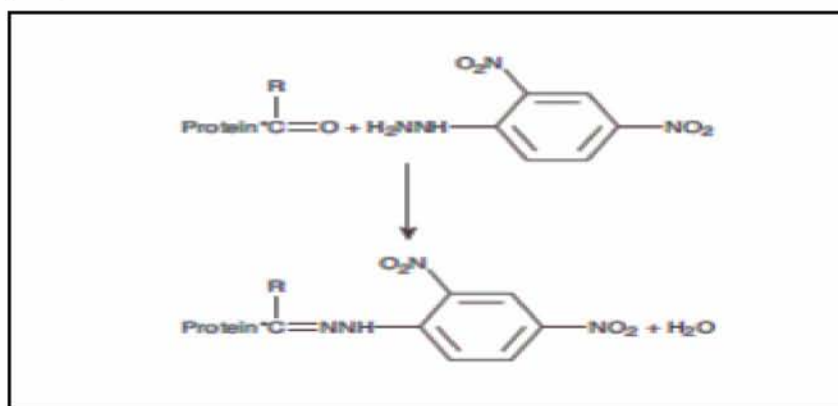
Ε) Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.

Ε1) Αρχή της Μεθόδου.

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

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε

μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.



Εικόνα 20. Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

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

E2) Αντιδραστήρια.

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

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 NHCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 NHCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 NHCl 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 mMDNPH διαλύουμε 0.2833 gDNPH 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 2NHCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈70 mL αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

E3)Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε 50 μ L πλάματος προσθέτουμε 50 μ L 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 κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

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

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

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

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

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

Ε4)Υπολογισμοί.

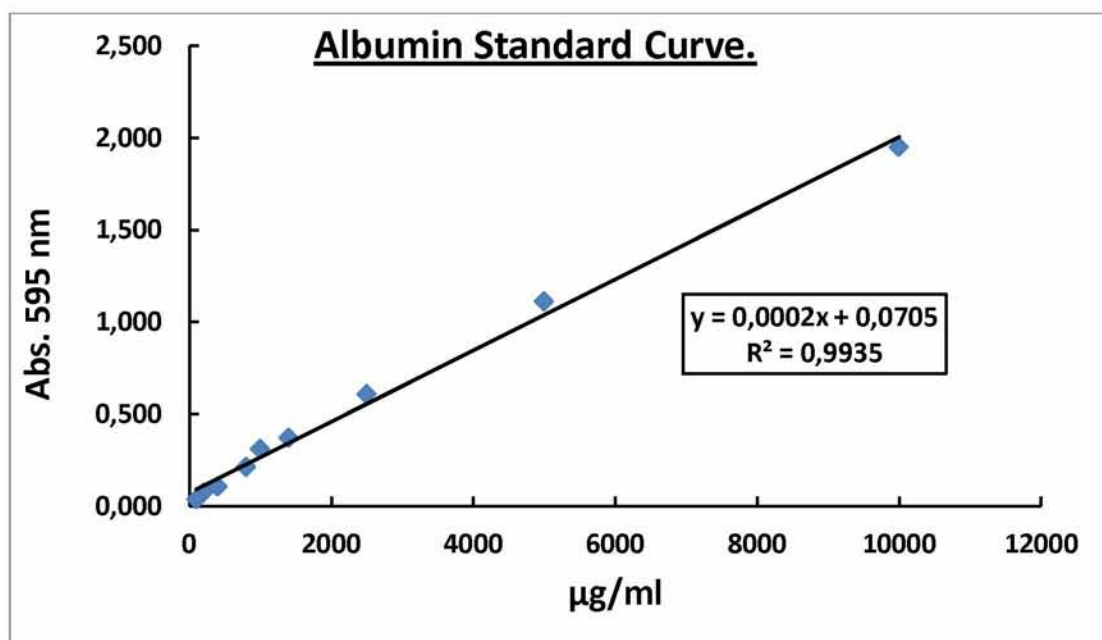
Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50 \times 2$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το $1000/50$ είναι ο συντελεστής αραιώσης ($1000 \mu\text{L}$ στην κυβελίδα / $50 \mu\text{L}$ δείγματος). Χ 2 διότι προσθέτουμε (αραιώση 1/1 TCATCA 20% αρχικά).

2.6. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες στον Ηπατικό, Παγκρεατικό και Στομαχικό Ιστό.

2.6.1.GSH .

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

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



Διάγραμμα 4. Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης.

2.6.2. Δραστηριότητα της Καταλάσης.

Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτήν του αιμολύματος, πλην όμως αντί για αιμόλυμα 4 μL αραιωμένου 1/10, προσθέτουμε 40 μL ομογενοποιημένου ιστού, αραιωμένου 1/3 με PBS. Αντί για 2.991 μL Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4, προσθέτουμε σε κάθε δείγμα προς μέτρηση 2.955 μL buffer. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM. Επειδή στα είκοσι (20) ηπατικά δείγματα, η αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου γίνονταν σε πολύ μικρότερο χρόνο από αυτόν των δύο (2) λεπτών της ώρας, στον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου, ελήφθη υπόψη, ξεχωριστά ο χρόνος αντίδρασης για κάθε δείγμα.

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

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

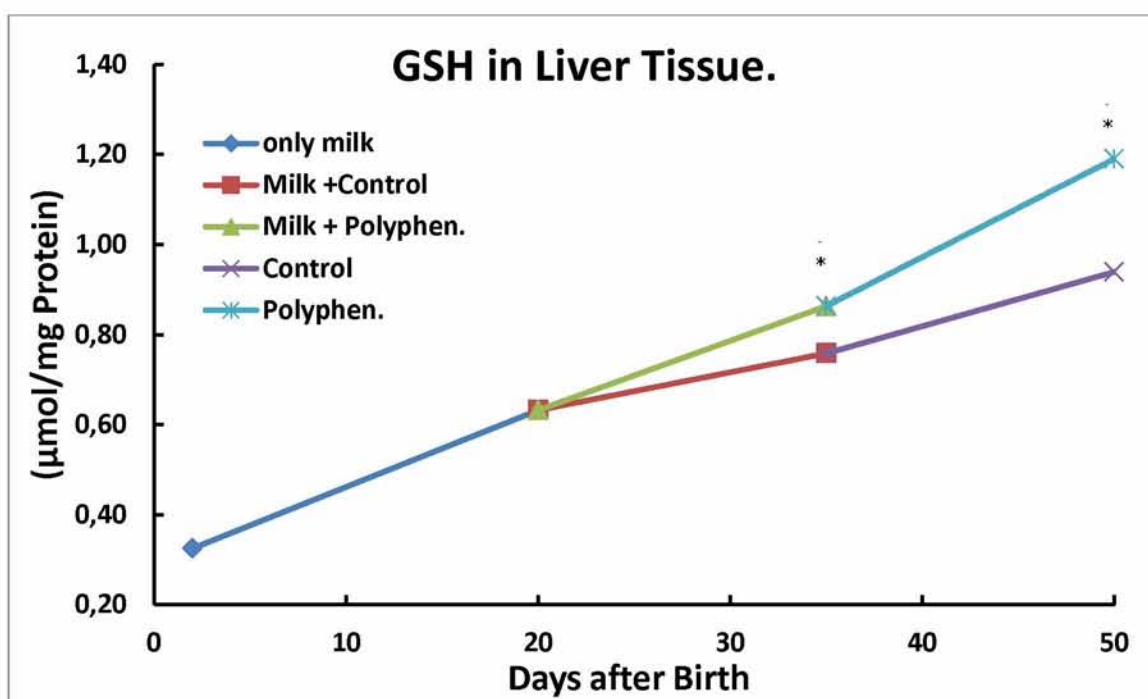
TBARS – Καρβονόλια.

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (onewayANOVA), με το πρόγραμμα PASWStatistics 18 (πρώην SPSSStatistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$.

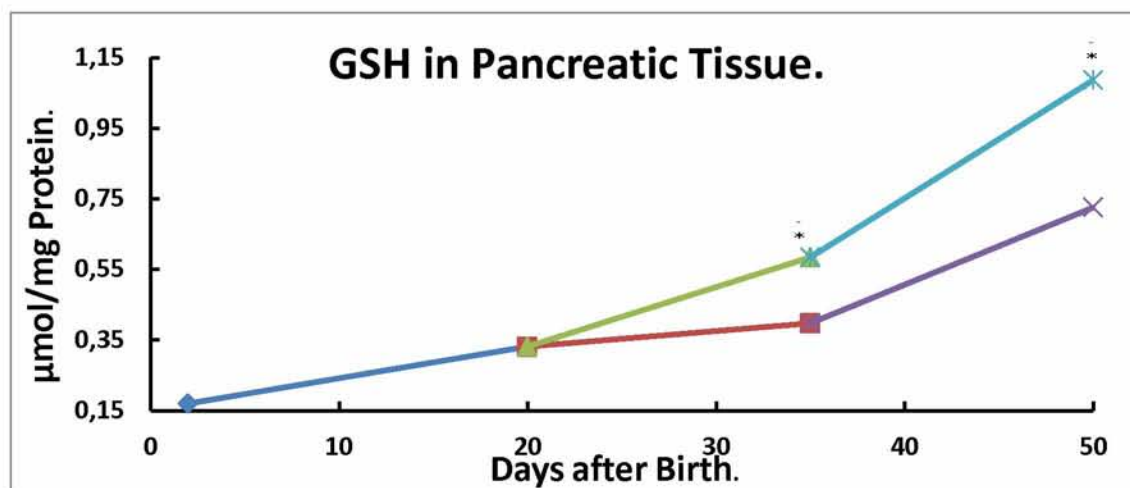
Στα διαγράμματα 5 έως 19 που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων στους ιστούς (ήπαρ, πάγκρεας και στόμαχο), στους χοίρους που συμμετείχαν στο συγκεκριμένο πείραμα.



Διάγραμμα 5. GSH στον Ηπατικό ιστό ($p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά ιστολογία).*

Ήπαρ	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα	13,85	26,73

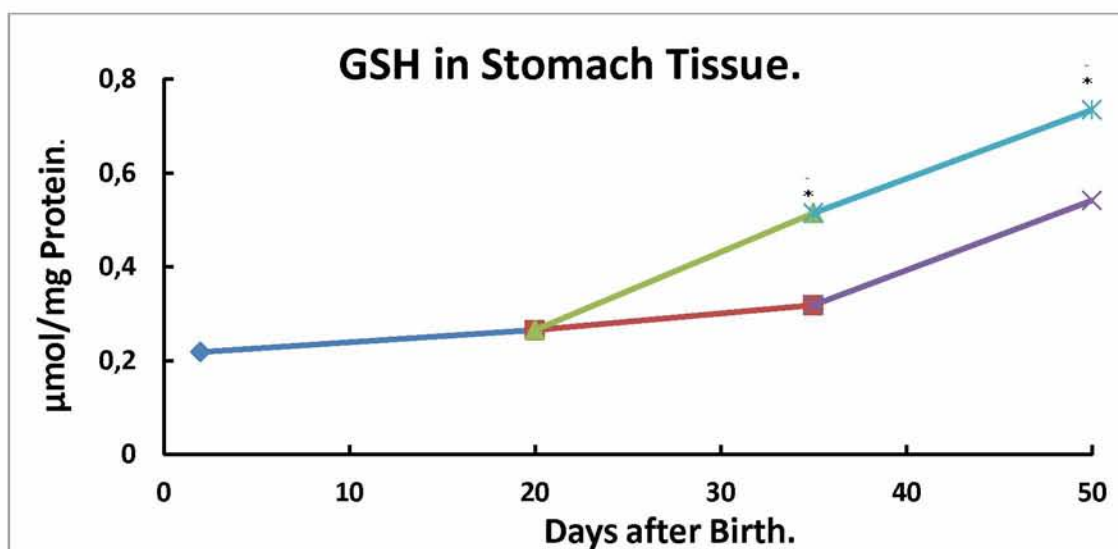
Πίνακας 8. Αύξηση GSH στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.



Διάγραμμα 6. GSH στον Παγκρεατικό Ιστό.

Πάγκρεας	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα.	47,1	49,79

Πίνακας 9. Αύξηση GSH στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

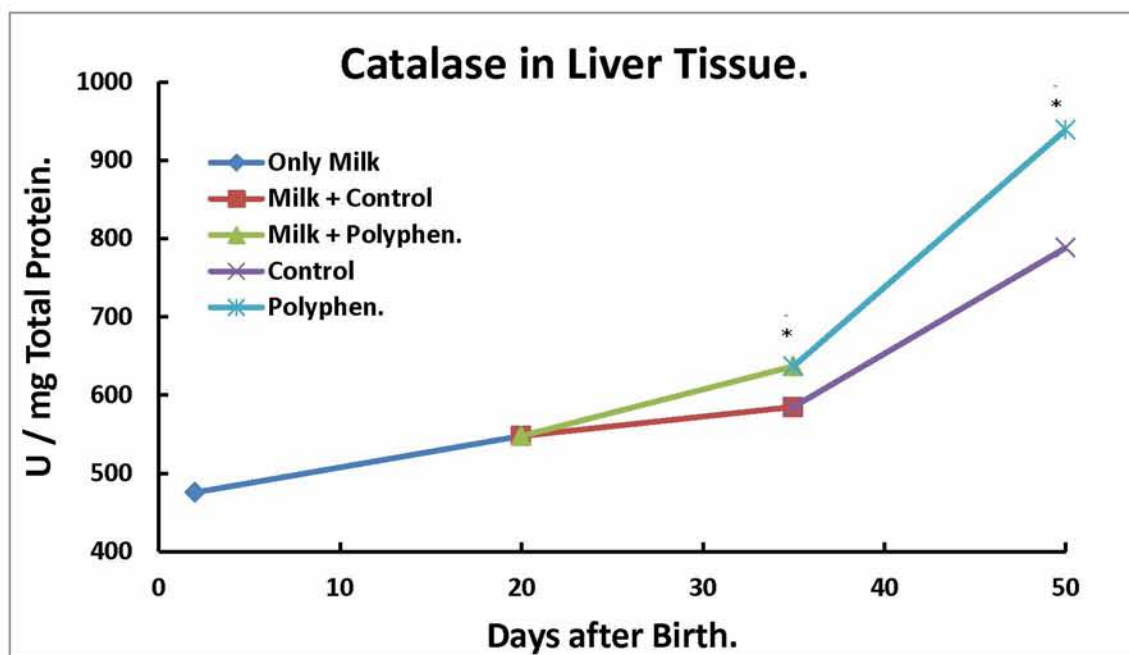


Διάγραμμα 7. GSH στον Στομαχικό Ιστό.

Στομαχικός	35 days	50 days
Αύξηση επί % GSH στην Πολυφαιν. Ομάδα	61,64	35,67

Πίνακας 10. Αύξηση GSH στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

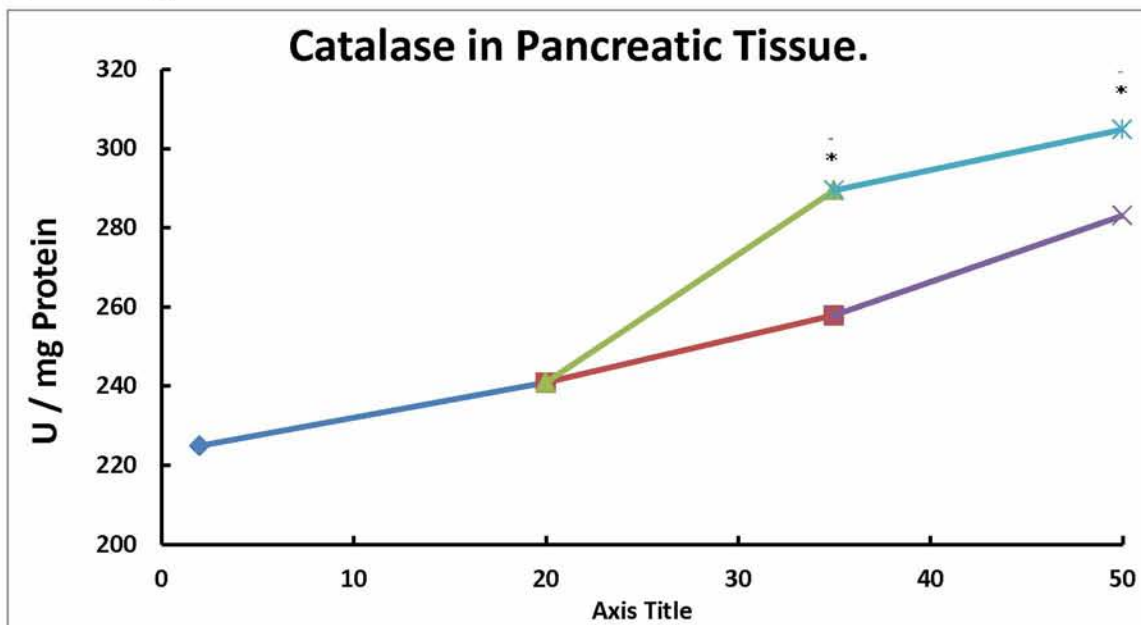
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της GSH στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον παγκρεατικό ιστό κατά 49,79%.



Διάγραμμα 8. Καταλάση στο Ήπαρ (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά αιμοληψία).

Ήπαρ	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαιν. Ομάδα.	8,88	19,19

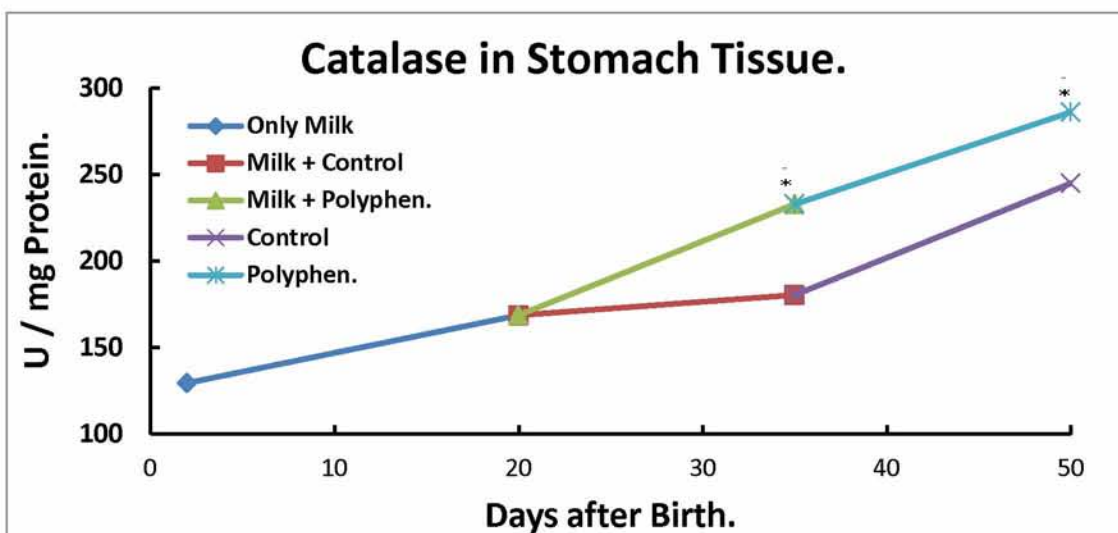
Πίνακας 11. Αύξηση Καταλάσης στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.



Διάγραμμα 9. Καταλάση στον Παγκρεατικό Ιστό.

Πάγκρεας	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαινολική Ομάδα.	12,23	7,69

Πίνακας 12. Αύξηση Καταλάσης στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

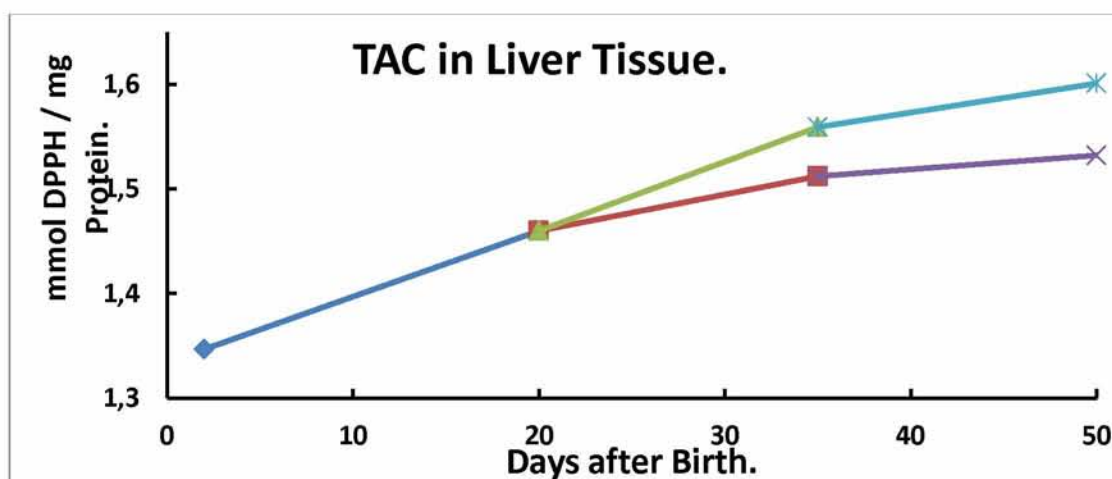


Διάγραμμα 10. Καταλάση στον Στομαχικό Ιστό.

Στόμαχος	35 days	50 days
Αύξηση επί % Catalase στην Πολυφαιν. Ομάδα.	22,12	16,79

Πίνακας 13. Αύξηση Καταλάσης στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

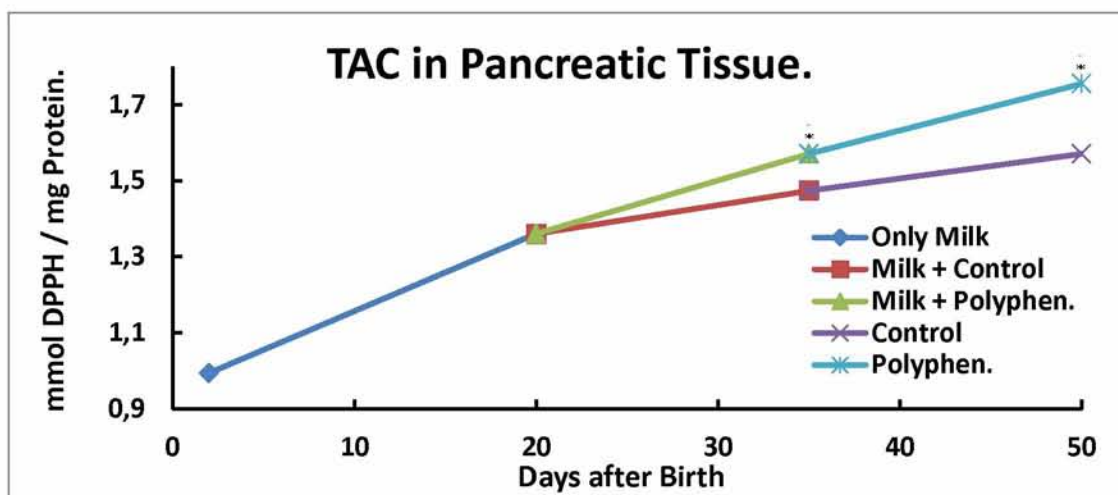
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον παγκρεατικό ιστό κατά 19,19%.



Διάγραμμα 11. TAC στον Ηπατικό Ιστό (* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control ανά ιστολογία).

Ήπαρ	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα.	3,11	4,50

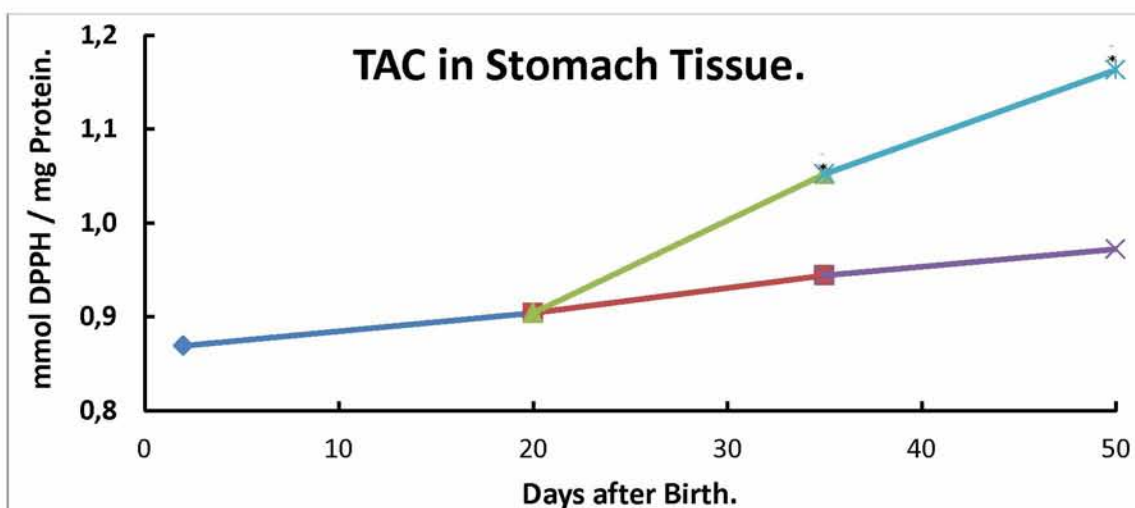
Πίνακας 14. Αύξηση TAC στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.



Διάγραμμα 12. TAC στον Παγκρεατικό Ιστό των Χοίρων.

Πάγκρεας	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα.	6,58	11,72

Πίνακας 15. Αύξηση TAC στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

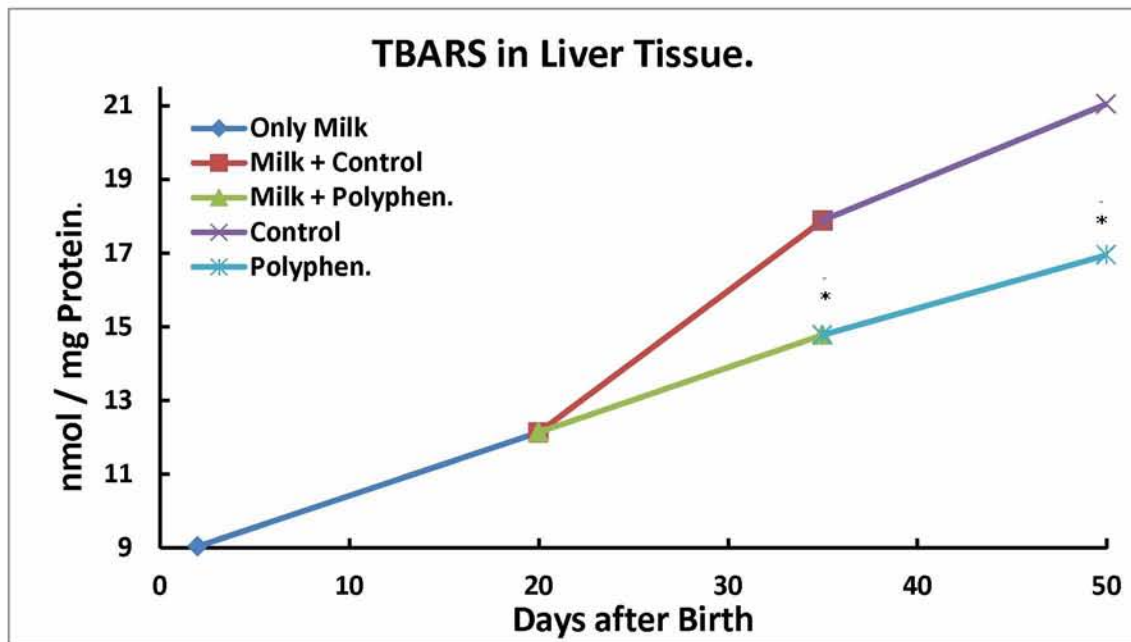


Διάγραμμα 13. TAC στον Στομαχικό Ιστό των Χοίρων.

Στόμαχος	35 days	50 days
Αύξηση επί % TAC στην Πολυφαιν. Ομάδα.	11,44	19,65

Πίνακας 16. Αύξηση TAC στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

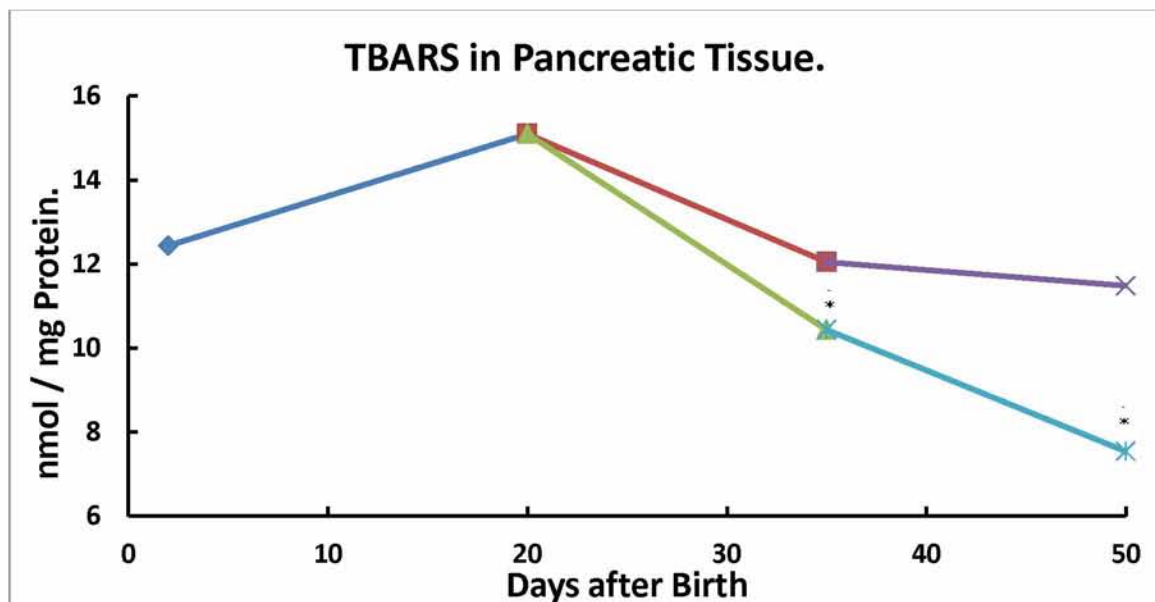
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει αύξηση της TAC, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη αύξηση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον στομαχικό ιστό κατά 19,65%.



Διάγραμμα 14. TBARS στο Ήπαρ των Χοίρων.

Ήπαρ	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν.Ομάδα.	17,39	19,49

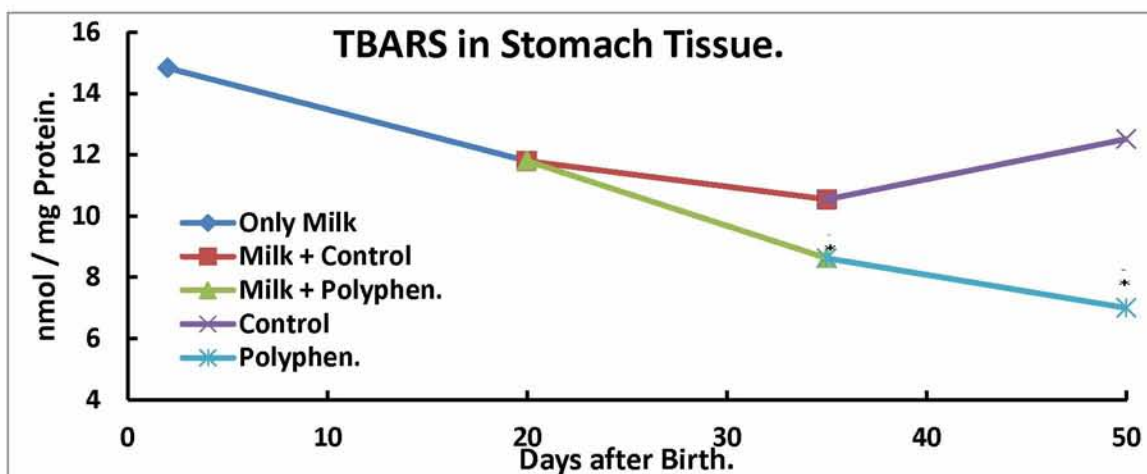
Πίνακας 17. Μείωση TBARS στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.



Διάγραμμα 15. TBARS στον Παγκρεατικό Ιστό των Χοίρων.

Πάγκρεας	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	13,38	34,35

Πίνακας 18. Μείωση TBARS στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

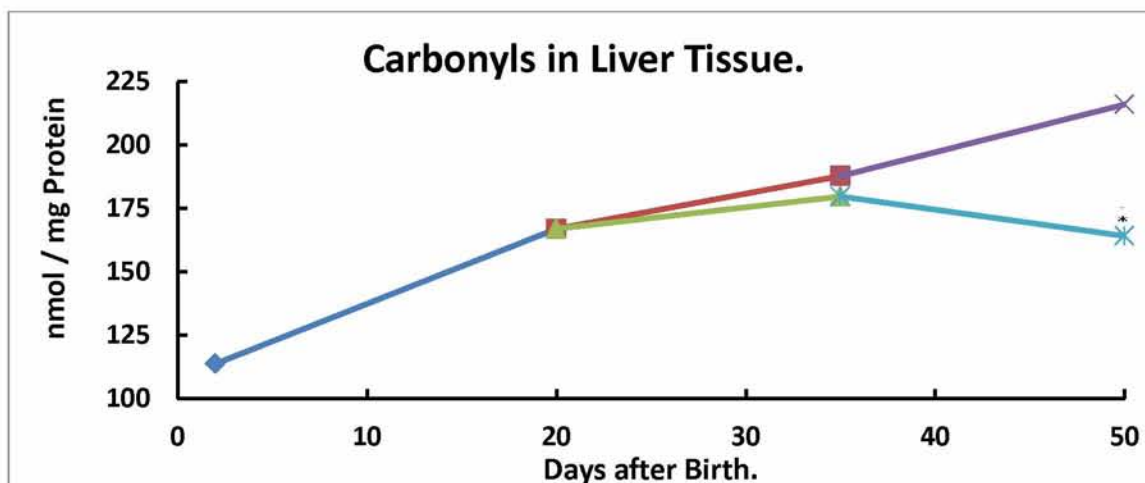


Διάγραμμα 16. TBARS στον Στομαχικό Ιστό των Χοίρων.

Στόμαχος	35 days	50 days
TBARS μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	18,26	44,12

Πίνακας 19. Μείωση TBARS στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

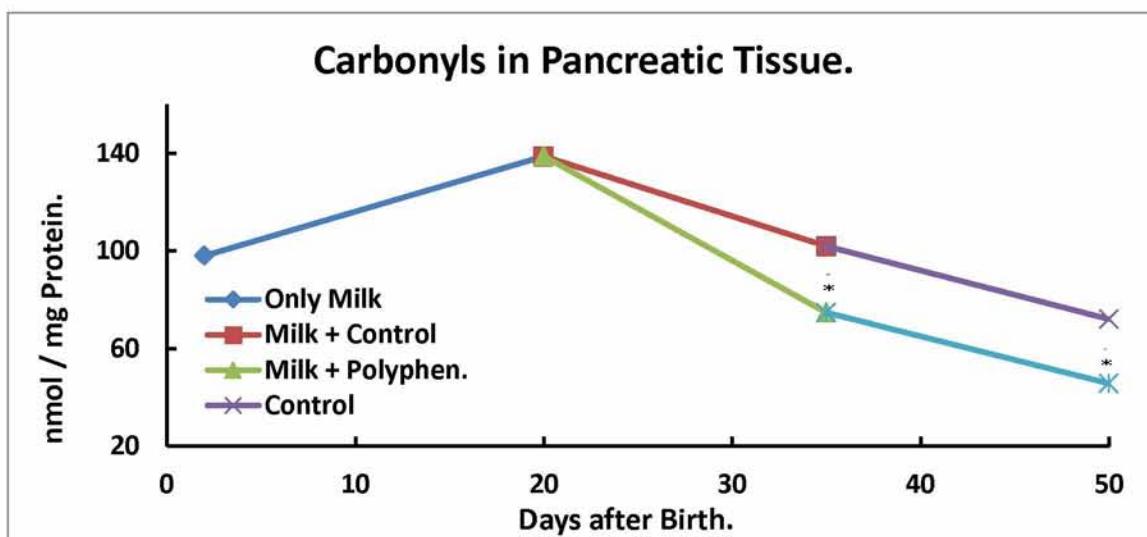
Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει μείωση των TBARS στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη μείωση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον στομαχικό ιστό κατά 44,12%.



Διάγραμμα 17. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Ηπατικό Ιστό.

Ηπατικός	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	4,29	24,01

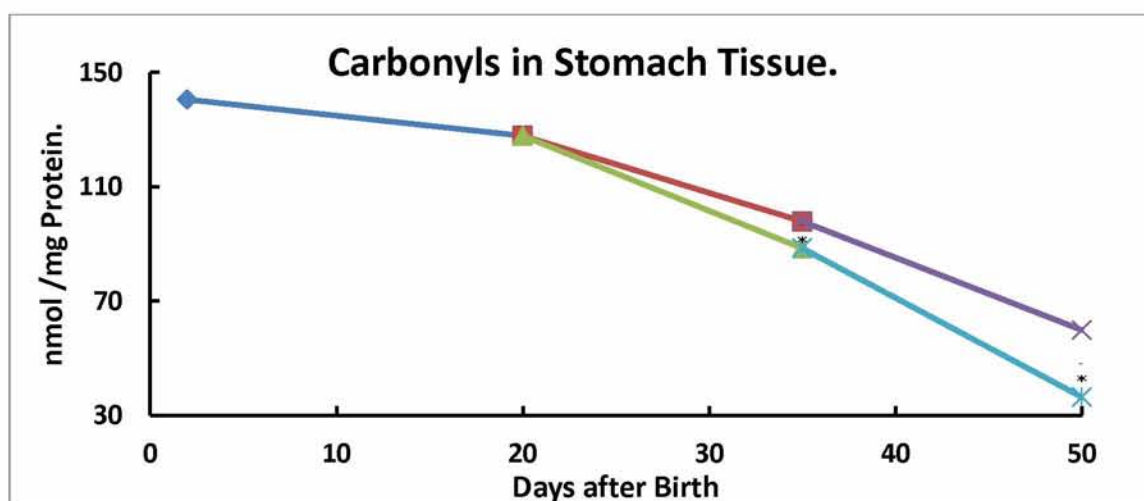
Πίνακας 20. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Ήπαρ της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.



Διάγραμμα 18. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Παγκρεατικό Ιστό.

Παγκρεατικός	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	26,71	36,59

Πίνακας 21. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στο Πάγκρεας της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

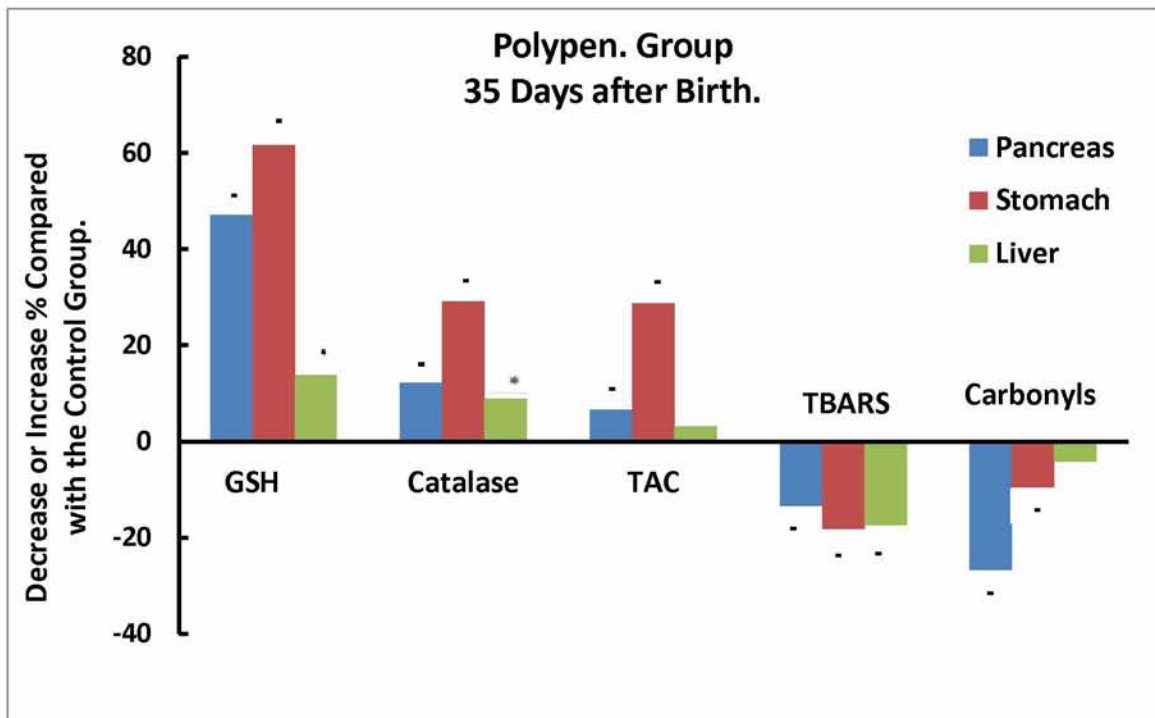


Διάγραμμα 19. Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στον Στομαχικό Ιστό.

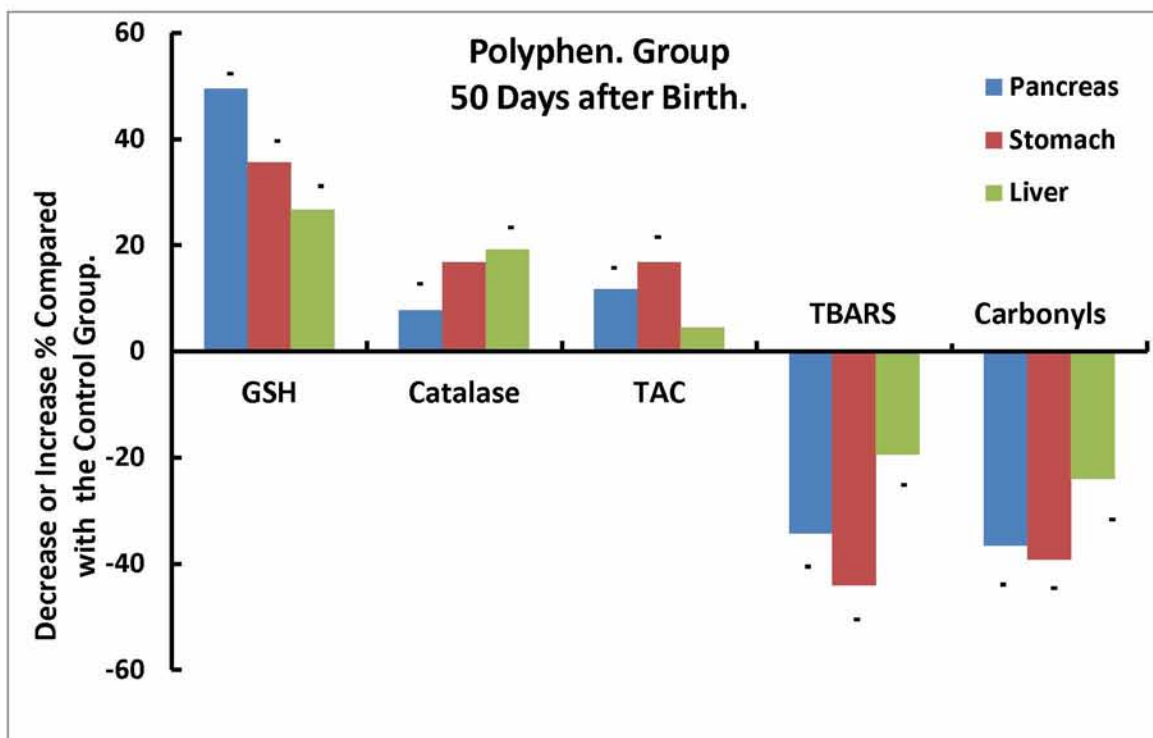
Στομαχικός	35 days	50 days
Carbonyls μείωση % στην Πολυφαιν. Ομάδα.	9,62	39,21

Πίνακας 22. Μείωση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στον Στόμαχο της Πολυφαινολικής Ομάδας σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου.

Από τα τρία (3) παραπάνω διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι σε όλους τους ιστούς της πολυφαινολικής ομάδας, υπάρχει μείωση των καρβονυλίων στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεγαλύτερη μείωση πενήτα (50) ημέρες μετά την γέννηση, παρατηρείται στον στομαχικό ιστό κατά 39,21%.



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



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

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις 22 δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν στις πολυφαινόλες των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, από το έτος 2001 μέχρι και σήμερα, με πρόσφατες των (Yamada K, et.al. 2009, Viveros A. et. al. 2011), δεν συναντάται μελέτη στην οποία να γίνεται αναφορά, στην παραγωγή φυσικών εκχυλισμάτων, υψηλής προστιθέμενης αξίας, από τα φυτικά νερά του ελαιοκάρπου και στην ολοκληρωμένη αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους σε ζωικούς οργανισμούς. Η προσέγγιση του θέματος μέχρι και σήμερα είχε ως αποτέλεσμα, έργο που αφορούσε στην λήψη πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Y.A.E.), σε κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η έρευνα προσανατολίστηκε σε νεαρά γουρούνια κρεατοπαραγωγής και στην μέτρηση δεικτών του οξειδωτικού στρες στο αίμα και σε ιστούς.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτραφούν είκοσι (20) χοίροι, να διαχωριστούν σε δύο (2) ομάδες και να τραφούν με δύο (2) διαφορετικά σιτηρέσια ανάλογα την ομάδα στην οποία ανήκουν, με στόχο τον έλεγχο των δεικτών του οξειδωτικού στρες στον ηπατικό, στομαχικό και παγκρεατικό ιστό ώστε να μελετηθεί εάν θα υπήρχε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τους σε νεαρή ηλικία.

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

Εκτελέστηκαν τέσσερις (4) ιστοληψίες (ηπατικός, παγκρεατικός και στομαχικός ιστός): δύο (2), είκοσι (20), τριάντα πέντε (35), και πενήντα (50) ημέρες από τη γέννηση των χοίρων. Πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι και την ημερομηνία (20) ημέρα από τη γέννηση, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη τη μέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα, η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε μετά την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα από τη γέννηση τους.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, καταλήγουμε στις παρακάτω παρατηρήσεις και συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον ηπατικό ιστό, παρατηρείται μια αύξηση στις τιμές της από την ημέρα του απογαλακτισμού μέχρι την πενήντα (50) ημέρα και στις δύο (2) ομάδες. Η

πολυφαινολική ομάδα όμως παρουσιάζει αυξημένες τιμές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά 13,85% την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα και κατά 26,73% την πεντηκοστή (50) μέρα με την μεγαλύτερη τιμή $1,190 \pm 0,017$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης. Το ίδιο παρατηρείται και στον παγκρεατικό ιστό με αυξήσεις κατά 47,1% και 49,79% της πολυφαινολικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις αντίστοιχες ημέρες με μεγαλύτερη τιμή $1,086 \pm 0,022$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης. Τέλος στον στομαχικό ιστό και για τις αντίστοιχες ημέρες παρατηρείται αύξηση 61,64% και 35,67% στη πολυφαινολική ομάδα με μέγιστη τιμή $0,734 \pm 0,010$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης. Από τις παραπάνω μέγιστες τιμές της GSH των τριών ιστών, η μεγαλύτερη παρατηρείται στον ηπατικό ιστό. Αυτή η αύξηση θεωρείται ευεργετική για τον οργανισμό των νεαρών χοίρων διότι θα μπορούν να αντιμετωπίζουν καλύτερα το οξειδωτικό στρες, δηλαδή θα μπορεί πιο εύκολα ο οργανισμός να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, να ενισχύει το αμυντικό σύστημα και να αποτοξινώνει το ήπαρ.

Η δραστηριότητα της καταλάσης στον ηπατικό ιστό, αυξάνεται με με το πέρασμα του χρόνου αλλά η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρείται στους ιστούς των ζώων που έλαβαν την τροφή με τα πολυφαινολικά πρόσθετα. Την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα η πολυφαινολική ομάδα στον ηπατικό ιστό, παρουσιάζει αυξημένες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά 8,88% και την πεντηκοστή (50) ημέρα κατά 19,19% με μέγιστη τιμή τα $938,675 \pm 10,635$ U/mg ολικής πρωτεΐνης. Στον παγκρεατικό ιστό επίσης παρατηρείται αύξηση για τις αντίστοιχες ημέρες. Πιο συγκεκριμένα την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα παρατηρείται αύξηση της τάξεως του 12,23% και την πεντηκοστή ημέρα αύξηση της τάξεως του 7,69% με μέγιστη τιμή τα $304,788 \pm 1,770$ U/mg πρωτεΐνης. Τέλος παρατηρείται και στον στομαχικό ιστό αύξηση της τάξεως του 22,12% και 16,79% για την τριακοστή πέμπτη (35) και πεντηκοστή μέρα αντίστοιχα (50) με μέγιστη τιμή τα $285,895 \pm 3,133$ U/mg πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα, υποβοηθούν στην δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Όσον αφορά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ηπατικού ιστού, αυτή παρουσιάστηκε ελαφρώς αυξημένη τόσο στις τριάντα πέντε (35) όσο και στις πενήντα (50) ημέρες μετά την γέννηση. Συγκεκριμένα στις 35 ημέρες η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο ήπαρ είχε αυξηθεί κατά 3,11% ενώ στις 50 ημέρες κατά 4,50% με μέγιστη τιμή εξουδετέρωσης τα $1,601 \pm 0,013$ mmol DPPH/ mg πρωτεΐνης. Επίσης, μέσω της χορήγησης του πολυφαινολικού σιτηρεσίου, αυξήθηκε και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πάγκρεας στις τριάντα πέντε (35) και στις (50) ημέρες. Στις τριάντα πέντε (35) ημέρες

παρατηρήθηκε αύξηση της τάξεως του 6,58% ενώ στις πενήντα ημέρες παρατηρήθηκε αύξηση της τάξεως του 11,72% με μέγιστη τιμή εξουδετέρωσης $1,754 \pm 0,008 \text{ mmolDPPH/mg}$ πρωτεΐνης. Τέλος, στον στομαχικό ιστό παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητάς του. Στις τριάντα πέντε (35) ημέρες παρατηρήθηκε αύξηση 11,44% της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του στομάχου και στις πενήντα (50) ημέρες 19,65% αύξηση, με μέγιστη τιμή εξουδετέρωσης $1,163 \pm 0,009 \text{ mmolDPPH/ mg}$ πρωτεΐνης. Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως οι πολυφαινόλες που λαμβάνονται από την αντίστοιχη ομάδα, υποβοηθούν στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Όσον αφορά στις ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρατηρούνται τα εξής. Στον ηπατικό ιστό και στην ηλικία των δύο (2) ημερών η οξείδωση των λιπιδίων είναι μικρή. Όσο περνάνε οι μέρες αυξάνεται η οξείδωση των λιπιδίων. Πλην όμως, στην πολυφαινολική ομάδα σε ηλικία τριανταπέντε (35) και πενήντα (50) ημερών παρατηρούνται τιμές στατιστικά σημαντικές, μειωμένες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά 17,39% και 19,49% αντίστοιχα. Στον παγκρεατικό ιστό παρατηρείται από την ηλικία των δύο (2) ημερών μέχρι και την ηλικία των είκοσι (20) ημερών που τα νεαρά χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα μία αύξηση των TBARS από $12,43 \text{ nmol/mg}$ πρωτεΐνης σε $15,09 \text{ nmol/mg}$ πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, παρατηρείται μια συνεχής πτώση, με μεγαλύτερη μείωση των TBARS στην πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου 13,38% στις τριάντα πέντε (35) ημέρες και 34,35% στις πενήντα (50) ημέρες. Η ελάχιστη τιμή των TBARS που παρουσιάζει ο παγκρεατικός ιστός είναι $7,535 \pm 0,183 \text{ nmol/mg}$ πρωτεΐνης, στην ηλικία των πενήντα (50) ημερών. Στον στομαχικό ιστό έχουμε υψηλές τιμές από την ηλικία των δύο (2) ημερών $14,827 \text{ nmol/mg}$ πρωτεΐνης, οι οποίες ελαττώνονται με το πέρασμα του χρόνου μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα. Μετά, έχουμε μία αύξηση τιμών στην ομάδα ελέγχου έως την πενηκοστή (50) μέρα σε αντίθεση με την πολυφαινολική ομάδα όπου συνεχίζεται η μείωση των τιμών των TBARS. Η μικρότερη τιμή στον στομαχικό ιστό, στις πενήντα (50) ημέρες, που παρατηρείται στην πολυφαινολική ομάδα είναι κατά 44,42% μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($6,991 \pm 0,181 \text{ nmol/mg}$ πρωτεΐνης). Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η πολυφαινολική ομάδα και στους 3 ιστούς παρουσιάζει μειωμένες τιμές στα TBARS, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μικρότερη οξείδωση στα λιπίδια. Άξιο προσοχής είναι, ότι ενώ στον στομαχικό και στον παγκρεατικό ιστό με την γέννηση των χοιριδίων είχαμε μεγάλες τιμές, οι οποίες με την

πάροδο του χρόνου ελαττώνονταν, αντίθετα, στον ηπατικό είχαμε μικρότερες τιμές, οι οποίες αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου.

Τέλος, μελετήθηκε και η οξειδωση των πρωτεϊνών. Η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την πολυφαινολική ομάδα, ενώ η τελευταία, μειώνει συνεχώς την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συγκεκριμένα, στον ηπατικό ιστό στις τριάντα πέντε (35) ημέρες παρατηρείται μία μείωση 4,29% στην οξειδωση των πρωτεϊνών και στις πενήντα ημέρες (50) μία μεγάλη μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών κατά 24,01% με τιμή $164,084 \pm 4,377 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης}$. Στον παγκρεατικό ιστό στις τριάντα πέντε (35) ημέρες παρουσιάζεται μείωση 26,71% ενώ στις πενήντα ημέρες ακόμα μεγαλύτερη μείωση της τάξεως του 36,59% με μέγιστη τιμή τα $45,654 \pm 1,325 \text{ nmol/mg ολικής πρωτεΐνης}$. Τέλος στον στομαχικό ιστό παρουσιάστηκε μείωση στις τριάντα πέντε (35) και στις πενήντα (50) ημέρες κατά 9,62% και 39,21% αντίστοιχα με μέγιστη τιμή μείωσης $36,364 \pm 1,183 \text{ nmol/mg ολικής πρωτεΐνης}$. Τα παραπάνω υποδεικνύουν πως οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε αυτήν την ομάδα υποβοηθούν στη μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα πολυφαινολικά πρόσθετα στο σιτηρέσιο των χοίρων κρεατοπαραγωγής, δρύνε ως αντιοξειδωτικά διότι, για παράδειγμα, η πολυφαινολική ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, κατά την τελευταία ιστοληψία στον ηπατικό, παγκρεατικό και στομαχικό ιστό αντίστοιχα, αυξάνει την τιμή της TAC κατά 4,50%, 11,72% και 19,65%. Επίσης παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές μειωμένες συγκεντρώσεις στην οξειδωση των πρωτεϊνών κατά 24,01%, 39,21% και κατά 36,59%. Η οξειδωση των λιπιδίων μειώνεται κατά 19,49%, 34,35% και 44,12% και αυξάνεται δραστηριότητα της καταλάσης κατά 19,19%, 7,69% και κατά 16,77%. Τέλος, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως ενδογενές αντιοξειδωτικό, εμφανίζει αύξησης κατά 26,73%, 49,49% και 35,67% οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που σημαίνει ότι στα χοιρίδια η χορήγηση πολυφαινολικού σιτηρεσίου αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Η χρήση των πολυφαινολικών προσθέτων από τα επεξεργασμένα ΥΑΕ απέδειξαν την αντιοξειδωτική τους δράση, πάνω σε χοίρους κρεατοπαραγωγής σε νεαρή ηλικία.

Ένα άλλο σπουδαίο όμως σημείο που πρέπει να επισημανθεί είναι πως οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια ρυπαντική παράμετρο, η οποία ευθύνεται για τις πολύ σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις των Υ.Α.Ε. Άρα, εάν προκύψουν μέθοδοι απομόνωσής των πολυφαινολών, τότε τα απόβλητα ελαιοτριβείου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για

παράδειγμα στην ενσίρωση για τα οικότροφα ζώα και στην υδρολίπανση. Αντίστοιχα, εφόσον απομονωθούν οι πολυφαινόλες και εκτιμηθούν οι αντιοξειδωτικές ικανότητές τους, θα μπορούσε να προκύψει ένα προϊόν με αυξημένη προστιθέμενη αξία.

Για τη διεξαγωγή επιπρόσθετων συμπερασμάτων προτείνεται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αίματος και των ιστών που ελήφθησαν από τα νεαρά χοιρίδια, με τη χρήση HPLC-MS, έτσι ώστε να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν οι επιμέρους ενώσεις και μέσα σε αυτές και τυχόν πολυφαινόλες των επεξεργασμένων Υ.Α.Ε που να μην έχουν μεταβολιστεί και να βρίσκονται στο αίμα και στους ιστούς αυτών. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο, θα γνωρίζουμε ποιες ακριβώς πολυφαινόλες από τα Υ.Α.Ε. έχουν συμμετάσχει στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των χοιριδίων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aebi, H. (1984) **Catalase in vitro**. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
2. AICR (2007) **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**; *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research*, Washington, DC, USA,
3. Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. (2000). **Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids**. *FreeRadic. Res.***33**:91– 103.
4. Aqil F., Gupta A., Munagala R., Jeyabalan J., Kausar H., Sharma R. J., Singh I. P. and Gupta R. C. (2012) **Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts From Syzygium cumini L. (Jamun, the Indian Blackberry)** *Nutrition and Cancer*, **64**(3): 428–438
5. Alexander D. D., Cushing C. A. (2009). **Quantitative assessment of red meat or processed meat consumption and kidney cancer**. *Cancer Detection and Prevention* **32**: 340–351
6. Arab L. (2010) **Epidemiologic Evidence on Coffee and Cancer** *Nutrition and Cancer*, **62**(3): 271–283
7. Arcidiacono B., Iiritano S., Nocera A., Possidente K., Nevolo M. T., Ventura V., Foti D., Chiefari E., and Brunetti A. (2012) **Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms** *Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research* pp. 1-12
8. Arts ICW, Hollman PCH. (2005) **Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies**.*AmJClinNutr***81**:317-25.
9. Baliga M. S., Haniadka R., Pereira M. M., D’Souza J. J., Pallaty P. L., Bhat H. P. and Popuri S. (2011)**Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and its Phytochemicals** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**:499–523
10. Banerjee S., Panda C. K. and Das S. (2006) **Clove (Syzygium aromaticum L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer***Carcinogenesis* **27**(8):1645–1654
11. Battin E. E., Brumaghim J. L. (2009) **Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms***Cell Biochem Biophys***55**:1–23
12. Bidinotto L., López de Cicco R., Vanegas J. E., Santucci- Pereira J., Vanden Heuvel J. P., Washington S., Aliaga C., Xu H., Russo I. H., Manni A., El-Bayoumy K. and Russo

- J. (2012) **Fish Oil Alters Tamoxifen-Modulated Expression of mRNAs That Encode Genes Related to Differentiation, Proliferation, Metastasis, and Immune Response in Rat Mammary Tumors** *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 991–999
13. Boon E M, Downs A and Marcey D. (2007) **Proposed Mechanism of Catalase In Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase.** *Catalase Structural Tutorial Text*.
14. Bosetti C., Pelucchi C. and La Vecchia C. (2009) **Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats** *Public Health Nutrition*: **12**(9A): 1595–1600
15. Boubaker J., Wissem B., Mohammed B. S., Ines B., Mounira K., Ines S., Genviève D. F. M., Kamel G. and Leila C. D. (2012) **Flavonoids Products from *Nitraria retusa* Leaves Promote Lymphoblastoid Cells Apoptosis.** *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 1095–1102
16. Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R. and Karaca B. (2012) **Effects of *Thymus serpyllum* Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1245–1250
17. Bravo L. (1998). **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance**, *Nutr Rev*, **56**, (11): 317-33.
18. Brownell K. D. and Warner K. E. (2009) **The Perils of Ignoring History: Big Tobacco Played Dirty and Millions Died. How Similar Is Big Food?** *The Milbank Quarterly*, **87**(1):259–294
19. Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., Covas, M.I. (2011). **The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial.** *Clinical Nutrition*, **30** (4), pp. 490-493.
20. Cicerale S., Conlan X. A., Sinclair A. J. and Keast R. S. J. (2009) **Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**:218–236
21. Cicerale, S., Lucas L., Russell, K. (2010) **Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil.** *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 458-479.
22. Chang K. T., Lampe J. W., Schwartz Y., Breymeyer K. L., Noar K. A., Song X., Neuhaus M. L. (2012) **Low Glycemic Load Experimental Diet More Satiating Than High Glycemic Load** *Diet Nutrition and Cancer*, **64**(5): 666-673
23. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004) **Diversity of structures and properties among catalases.** *Cellular and Molecular Life Sciences* **61** (2), pp. 192-208.

24. Chen Q. and Ross A. C. (2012) **All-Trans-Retinoic Acid and the Glycolipid α -Galactosylceramide Combined Reduce Breast Tumor Growth and Lung Metastasis in a 4T1 Murine Breast Tumor Model** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1219–1227
25. Christensen K. Y., Naidu A., Parent m. E., Pintos J., Abrahamowicz M., Siemiatycki J. and Koushik A. (2012) **The Risk of Lung Cancer Related to Dietary Intake of Flavonoids.** *Nutrition and Cancer*, **64**(7): 964–974
26. Chrupek M., Siipi H., Martinelli L. (2012) **Bio-objects as “boundary crawlers:” the case of microRNAs***Croat Med J.* **53**:285-8
27. Cooke M. S., Evans m. D., Dizdaroglu M. and lunec J. (2003) **Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease** *FASEB J.* **17**: 1195–1214
28. Couto E., Sandin S., Lo M., Ursin G., Adami H.-O., and Weiderpass E. (2013) **Mediterranean Dietary Pattern and Risk of Breast Cancer***PLoS ONE***8**(2): e55374 pp.1-11
29. De Stefani E., Deneo-Pellegrini H., Ronco A. L., Boffetta P., Correa P., Aune D., Mendilaharsu M., Acosta G., Silva C., Landó G. and Luaces M. E. (2012) **Meat Consumption, Cooking Methods, Mutagens, and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: A Case-Control Study in Uruguay** *Nutrition and Cancer*, **64**(2): 294–299
30. Devasagayam, TPA; Tilak JC, Boloor KK, Sane Ketaki S, GhaskadbiSaroj S, Lele RD (2004). **Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects.***Journal of Association of Physicians of India (JAPI)***52**: 796.
31. Dew T., Day A., Morgan M. (2005). **Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components.** *Department of Food Science*, University of Leeds.
32. Dirven HAAM, van Ommen B, van Bladeren PJ. (1995). **Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione.** *CancerRes.***54**:6215–20.
33. Djuric Z. (2011) **The Mediterranean diet: Effects on proteins that mediate fatty acid metabolism in the colon** *Nutr Rev.* **69**(12): 730–744
34. Fiander H, Schneider H. 2000. Dietary ortho phenols that induce glutathione Stransferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett.* 156:17–24.

35. Fujisawa S., Atsumi T., Ishihara M and Kadoma Y. (2004) **Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds** *Anticancer research* **24**: 563-570
36. Giaginis C. and Theocharis s. (2011) **Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum** *Nutrition and Cancer*, **63**(8): 1174–1184
37. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. (2005) **Flavonols, flavonones, flavanones and human health: Epidemiological evidence.** *JMedFood***8**:281-90.
38. Gill A., Ortega R. M. and Maldonado J. (2011) **Wholegrain cereals and bread: a duet of the Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases** *Public Health Nutrition*: **14**(12A): 2316–2322
39. Giacosa A., Barale R., Bavaresco L., Gatenbyl P., Gerbi V., Janssens J., Johnston B., Kas K., La Vecchia C., Mainguet P., Morazzoni P., Negri E., Pelucchi C., Pezzotti M. and Rondanelli M. (2013) **Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice** *European Journal of Cancer Prevention***22**:90–95
40. Gkoutosidis, P.E., Petrotos, K.B., Kokkora, M.I., Tziortziou, A.D., Christodouloulis, K., Goulas, P. (2011). **Olive mill waste water (OMWW) treatment by diafiltration desalination and water treatment.****30**(1-3), pp237-246.
41. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.***Methods in Enzymology***186**, pp. 1-85.
42. Halliwell B. (1994). **Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?** *Lancet***344**:721–724
43. Hamizah S., Roslida A. H., Fezah O., Tan K.L., Tor Y.S., Tan C.I. (2012) **Chemopreventive Potential of *Annona Muricata* L Leaves on Chemically-Induced Skin Papillomagenesis in Mice** *Asian Pacific J Cancer Prev*, **13**: 2533-2539
44. Jones P. A. (1986) **DNA Methylation and Cancer** *Cancer Res* **46**:461-466
45. Ibiebele T. I., Hughes M. C., Nagle C. M., Bain C. J., Whiteman D. C. and Webb P. M. (2013) **Dietary antioxidants and risk of Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus in an Australian population***Int. J. Cancer*: 00, 000–000 VC
46. Inoue M. and Tsugane S. (2012) **Insulin resistance and cancer: epidemiological evidence***Endocrine-Related Cancer***19**: 1–8
47. Pandey K.B. and Rizvi S.I. (2009) **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease***Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**(5): 270-278

48. Karpi J., Kurl S., Laukkanen J. A. and Kauhanen J. (2012) **Serum β -Carotene in Relation to Risk of Prostate Cancer: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study** *Nutrition and Cancer*, **64**(3): 361–367
49. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. (2001). **Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF Malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis.***Can J Neurol Sci.***28**: 141-143.
50. Khallouki F., Younos C., Soulimani R., Oster T., Charrouf Z., Spiegelhalter B., Bartsch H., Owen R. W. (2003) **Consumption of Argan Oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects***European Journal of Cancer Prevention* 12:67-75
51. Kiani F., Knutsen S., Singh P., Ursin G., Fraser G. (2006) **Dietary risk factors for ovarian cancer: the Adventist Health Study (United States)***Cancer Causes and Control* 17:137–146
52. Klein E. A., Thompson I. M., Tangen C. M., Crowley J. J., Lucia M. S., Goodman P. J. Minadian L. M., Ford L. G., Parnes H. J., Gaziano J. M., Karp D. D., Lieber M. M., Walther P. J., Klotz L., Parsons J. K., Chin J. L., Darke A. K., Lippman S. M., Goodman G. E., Meyskens F. L., Baker L. H. (2011) **Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)***JAMA* 306(14):1549-1556
53. Kloetzel M., Ehlers A., Niemann B., Buhrke T. and Lampen A. (2013) **Trans Fatty Acids Affect Cellular Viability of Human Intestinal Caco-2 Cells and Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptors** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 139–146
54. Kontou N., Psaltopoulou T., Soupos N., Polychronopoulos E., Linos A., Xinopoulos D. and Panagiotakos D. B. (2012) **The role of number of meals, coffee intake, salt and type of cookware on colorectal cancer development in the context of the Mediterranean diet** *Public Health Nutrition*: pp. 1-8
55. Kumar M., Sharma V. L., Sehgal A., and Jain M. (2012) **Protective Effects of Green and White Tea Against Benzo(a)pyrene Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Murine Model.** *Nutrition and Cancer*, **64**(2): 300–306
56. Kushi L. H., Doyle C., McCullough M., Rock C. L., Demark-Wahnefried W., Bandera E. V., Gapstur S., Patel A. V., Andrews K., Gansler T., and The American Cancer Society (2012) **Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for**

- Cancer Prevention Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity** *CA Cancer J Clin* **62**:30–67.
57. La Vecchia C. (2009) **Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk** *Nutrition Reviews* **67**(Suppl. 1):126–129
 58. La Vecchia C. (2004) **Mediterranean Diet and Cancer Public Health** *Nutrition*: **7**(7): 965-68
 59. Lee I. M., Cook N. R., Gaziano J. M., Gordon D., Ridker P. M., Manson J. E., Hennekens C. H., Buring J. E. (2005) **Vitamin E in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer The Women’s Health Study: A Randomized Controlled Trial** *JAMA*.**294** (5):56-65
 60. Li Y. and Tollefsbol T. O. (2010) **Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components** *Curr Med Chem*. **17**(20): 2141–2151.
 61. Lien EJ, Ren SJ, Bui HUH, Wang RB. (1999). **Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants.** *FreeRadic. Biol. Med.* **26**:285–94
 62. Lin Y. and Cai L. (2012) **Environmental and Dietary Factors and Lung Cancer Risk Among Chinese Women: A Case-Control Study in Southeast China** *Nutrition and Cancer*, **64**(4): 508–514
 63. Long H., Yang H., Lin Y., Situ D. and Liu W. (2013) **Fish Oil- Supplemented Parenteral Nutrition in Patients Following Esophageal Cancer Surgery: Effect on Inflammation and Immune Function** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 71–75
 64. Lye A. D. and Hayslip J. W. (2012) **Immunonutrition: Does It Have a Role in Improving Recovery in Patients Receiving a Stem Cell Transplant?** *Nutrition and Cancer*, **64**(4): 503–507
 65. Mebirouk, M., Sbai, L., Lopez, M., Gonzalez, J. (2007). **The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus phanerochaetae chrysosporium.***Grasas y Aceites* **58**(4), pp. 366-371.
 66. Mendivil-Perez M., Jimenez-Del-Rio M. and Velez-Pardo C. (2013) **Glucose Starvation Induces Apoptosis in a Model of Acute T Leukemia Dependent on Caspase-3 and Apoptosis-Inducing Factor: A Therapeutic Strategy** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 99–109
 67. Niaounakis, M., Halvadakis C.P. (2006). **Olive Processing Waste Management.** Literature Review and Patent Survey, 2nd Edition, Elsevier ISBN: 978-0-08-044851-0.

68. Niclis C., del Pilar Díaz M., Eynard A. R., Román M. D. and La Vecchia C. (2012) **Dietary Habits and Prostate Cancer Prevention: A Review of Observational Studies by Focusing on South America** *Nutrition and Cancer*, **64**(1): 23–33
69. Ntougias S., Bourtzis K. and Tsiamis G. (2013). **The Microbiology of Olive Mill Wastes. Review.** *BioMed Research International*.
70. Ou Y., Jiang B., Wang X., Ma W. and Guo J. (2012) **Selenium and Colorectal Adenomas Risk: A Meta- Analysis** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1153–1159
71. Oude Elferink S.J.W.H., Driehuis F., Gottschal J.C., and Spoelstra S.F (FAO Electronic Conference on Tropical Silage; Silage fermentation processes and their manipulation).
72. Ouédraogo M., Charles C., Ouédraogo M., Guissou I. P., Stévinny C. and Duez P. (2011) **An Overview of Cancer Chemopreventive Potential and Safety of Proanthocyanidins** *Nutrition and Cancer*, **63**(8): 1163–1173
73. Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F.-T., Zhou T.-T., Liu B. and Bao J.-K. (2012) **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis** *Cell Prolif.*, **45**: 487–498
74. Pal D., Banerjee S., Mukherjee S., Roy A., Panda C. K., Das S. (2010). **Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: Downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway.** *Journal of Dermatological Science* **59**:31–39.
75. Pani G., Galeotti T. and Chiarugi P. (2010) **Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress** *Cancer Metastasis Rev* **29**:351–378
76. Pastore A., Fedetici G., Bertini E., Piemonte F. (2003) **Analysis of Glutathione: Implication in Redox and Detoxification.** *Clin Chim Acta* **333**(1): 19-39.
77. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. (2004). **Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure.** *Neurosci Lett.*, **357**: 83-86.
78. Pauwels E.K. J. (2011) **The Protective Effect of the Mediterranean Diet: Focus on Cancer and Cardiovascular Risk** *Med Princ Pract.* **20**:103–111
79. Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F and Scalbert A. (2010). **Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database.** *J. Agric. Food Chem.* **58**, pp.4959-69

80. Ramnath V., Rekha P. S., Sujatha K. S. (2007). **Amelioration of Heat Stress Induced Disturbances of Antioxidant Defense System in Chicken by Brahma Rasayana.***Advance Access Publication eCAM* 2008; 5(1)77–84.
81. Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. (2004). **Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients.***Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
82. Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. (1952). **A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase.***Biol. Chem.*195:133-140.
83. Ryan, D., Robards, K. (1998). **Phenolic compounds in olives.***Analyst*123(5), pp. 31R-44R.
84. Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. (2004) **Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview** *Asian Pacific J Cancer Prev*, 5: 237-245
85. Shafique K., McLoone P., Qureshi K., Leung H., Hart C. and Morrison D. S. (2012) **Tea Consumption and the Risk of Overall and Grade Specific Prostate Cancer: A Large Prospective Cohort Study of Scottish Men.** *Nutrition and Cancer*, 64(6): 790–797
86. Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. (2008). **Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts.***Agric. Food Chem.* 56(16):6967-76.
87. Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. (2011). **Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation.***In Vivo.* 25(4):657-62.
88. Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J. 2007. **Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes.** *Agric. Food Chem.* 55(13):5246-52.
89. Takata Y., Xiang Y. B., Yang G., Li H., Gao J., Cai H., Gao Y. T., Zheng W. and Shu X. O. (2013) **Intakes of Fruits, Vegetables, and Related Vitamins and Lung Cancer Risk: Results from the Shanghai Men's Health Study (2002–2009)** *Nutrition and Cancer*, 65(1): 51–61
90. Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. (1992). **Phenolic compounds and stability of virgin olive oil.***Food Chemistry*45 (2), pp. 141-144.

91. Vainio H. (1999) **Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story** *British Medical Bulletin* **55** (3): 593-599
92. Vaya, J., Aviram M. (2001). **Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications.***Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 19(1), pp. 99-117.
93. Verma A. and Shukla G. (2013) **Probiotics Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus Suppresses DMH-Induced Procarcinogenic Fecal Enzymes and Preneoplastic Aberrant Crypt Foci in Early Colon Carcinogenesis in Sprague Dawley Rats** *Nutrition and Cancer*, **65**(1): 84–91
94. Wang Z. H., Gao Q. Y. and Fang J. Y. (2012) **Green Tea and Incidence of Colorectal Cancer: Evidence from Prospective Cohort Studies.** *Nutrition and Cancer*, **64**(8): 1143–1152
95. Weisburger J. H. (2001) **Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases** *Experimental Biology and Medicine* **226**:891-897.
96. Wells P. G., McCallum G. P., Chen C. S., Henderson J. T., Lee C. J. J., Perstin J., Preston T. J., Wiley M. J. and Wong A. W. (2009) **Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer***Toxicological Sciences***108**(1): 4–18
97. Worapol A., Maitree S. (2013). **Effect of polyphenols extracted from tamarind (Tamarindus indica L.) seed coat on pathophysiological changes and red blood cell glutathione peroxidase activity in heat-stressed broilers.** *Int J Biometeorol* **57**:137–143.
98. Xiao H. B., Fang J., Lu X. Y., Sun Z. L. (2013). **Kaempferol improves carcass characteristics in broiler chickens by regulating ANGPTL3 gene expression.** *British Poultry Science*. Vol. 53, Nr. 6, pp. 836-842.
99. Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. (2009). **Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus.***Antiviral Res.***83**(1):35-44.