



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

**Έκφραση και ενζυμική δραστικότητα των ενζύμων, S-
τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και υπεροξειδικής
δισμουτάσης (SOD) σε ιστούς (καρδιά, μυς, εγκέφαλος)
προβάτων, μετά από τη χορήγηση τροφής
εμπλουτισμένης με Υγρά Απόβλητα Ελαιολάδου**

**Expression and enzymatic activity of glutathione S-
transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) in
sheep (heart, muscle, brain) after introducing a feed
supplemented with olive oil mill wastewater**

Ραφτοπούλου Σοφία
Λάρισα 2018

Τριμελής Επιτροπή

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

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και να μου λύσει οποιαδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα πραγματοποίηση των πειραμάτων μου. Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Μακρή Σωτηρία, η οποία εκτελεί το διδακτορικό της πρόγραμμα, και τα δείγματα που χρησιμοποίησα για να εκτελέσω τα πειράματά μου, προήλθαν από το δικό της πρόγραμμα. Η κυρία Μακρή με συμβούλευε και με στήριζε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και χωρίς τις συμβουλές και τις γνώσεις της δεν θα είχα φτάσει στο τέλος της εκπόνησης αυτής τη εργασίας. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή τους διδάκτορες Κωνσταντίνο Γερασόπουλο, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Υπάτιο Σπανίδη και Κούκα Παρασκευή, οι οποίοι με τις συμβουλές και την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος για αυτό και τους αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία.

Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού είκοσι οχτώ (28) προβάτων, της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα», με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε) και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης στον καρδιακό, στον μυϊκό (τετρακέφαλος μυς) και στον ιστό του εγκεφάλου. Τα είκοσι οχτώ (28) πρόβατα που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε διαφορετικό σιτηρέσιο. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και λάμβανε το κοινό σιτηρέσιο ενώ η δεύτερη αποτελούνταν από τα νεαρά πρόβατα στο σιτηρέσιο των οποίων, προστέθηκαν Υ.Α.Ε, τα οποία είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, ώστε τελικά να προσδιοριστεί η ενζυμική δράση της υπεροξειδική δισμουτάσης (SOD) και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) μεταξύ των δύο ομάδων. Το πειραματικό πλάνο διήρκησε 70 ημέρες εκ των οποίων στις πρώτες 15 τα ζώα παρέμειναν με τις μητέρες τους και τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα, ενώ από εκεί και μετά χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (control & YAE) και μέχρι τις 42 ημέρες η τροφή τους εκτός από γάλα περιείχε και το σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τεσσαρακοστή δεύτερη (42) ημέρα μέχρι και την εβδομηκοστή (70) ημέρα από τη γέννηση τους, όπου τα πρόβατα τρέφονταν μόνο με το πειραματικό σιτηρέσιο. Πραγματοποιήθηκαν ιστοληψίες σε δυο χρονικές στιγμές, 42 και 70 ημέρες μετά τη γέννηση των αμνών, ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η δραστηριότητα της GST αυξήθηκε σημαντικά στην καρδιά και τον τετρακέφαλο μυ κατά 58.6 και 149.7% αντίστοιχα στις 70 ημέρες και μειώθηκε σημαντικά κατά 50.9% στην καρδιά στις 42 ημέρες, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή στους υπόλοιπους ιστούς. Τέλος η δραστηριότητα της SOD δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε κανέναν ιστό σε καμία από τις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

Abstract

For the purposes of this thesis, twenty-eight lambs from the Greek race “Chios” were used, in order to determine the antioxidant activity of their feed supplemented with polyphenolic compounds from olive oil mill wastewaters (OMW). Twenty-eight lambs were divided into two groups fed either with standard ratio or with diet supplemented with OMW in order to determine the enzymatic activity of GST and SOD between two groups. The experimental procedure lasted 70 days. Following an initial 15 day period where the lambs remained with their mothers and were only fed with breast milk, they were divided into two groups (control & OMW) and fed with milk and two experimental feeds (standard and OMW) until 42 days post birth. Sequentially, up to 70 days post birth, lambs were separated from their mothers and fed only with the experimental feed. Tissues, such as heart, brain and quadriceps muscle were collected at 42 and 70 days post birth to assess the effect of bio-functional feed on their welfare. The results showed that GST activity was significantly increased in heart and quadriceps muscle by 58.6 and 149.7% respectively at 70 days and significantly decreased by 50.9% in the heart at 42 days, while no statistically significant changes were observed in other tissues. Finally, SOD activity was not affected in any tissue between two groups, at any of the two sampling times.

Περιεχόμενα

<i>Τριμελής Επιτροπή</i>	2
<i>Ευχαριστίες</i>	3
<i>Περίληψη</i>	4
<i>Abstract</i>	5
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Γενικές Πληροφορίες	8
1.1 Φύση ατόμων	8
1.2 Ελεύθερες Ρίζες.....	10
2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου-ΔΜΟ	11
2.1 Γενικές Πληροφορίες για τις ΔΜΟ	11
2.2 Τρόποι Δημιουργίας Δραστικών Μορφών Οξυγόνου στον Οργανισμό	12
2.3 Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες	13
2.4 Αντιοξειδωτική Άμυνα - Αντιοξειδωτικές Ουσίες.....	14
2.5 Ένζυμα με Αντιοξειδωτική Δράση	16
3. Πολυφαινόλες	17
3.1 Γενικές Πληροφορίες	17
3.2 Βιοσύνθεση Πολυφαινολών	18
3.3 Τάξεις Πολυφαινολών	19
3.4 Επίδραση των Πολυφαινολών στην υγεία.....	21
4. Η Ελιά και οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου	22
4.1 Η Ελιά.....	22
4.2 Η συγκομιδή της ελιάς	23
4.3 Οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου	24
4.3.1 Κύριες πολυφαινόλες του ελαιολάδου	24
4.3.2 Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και των Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε.)	25
4.3.3 Προστατευτικός ρόλος πολυφαινολών από ΥΑΕ.....	25
5. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου	27
6. Βιολειτουργική Ζωτροφή και Πρόβατα	29
6.1 Γενικές Πληροφορίες για τα Πρόβατα των Πειραμάτων.....	29
6.1.1 Χαρακτηριστικά.....	29
6.1.2 Εγκυμοσύνη	29
6.1.3 Χιώτικο πρόβατο	30
6.2 Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών.....	30

7. Ιστοί που Μελετήθηκαν στο Πείραμα	31
7.1 Καρδιά	31
7.2 Εγκέφαλος	32
7.3 Τετρακέφαλος Μυς.....	33
Β. ΣΚΟΠΟΣ	35
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
1. Γενικές Πληροφορίες.....	36
2. Πειραματικός σχεδιασμός	36
3. Βιολειτουργική Ζωοτροφή – Ενσίρωμα.....	37
3.1 Διαδικασία Ενσίρωματος.....	37
3.1.1 Φάσεις ενσίρωσης.....	38
3.1.2 Χαρακτηριστικά ενσίρωματος.....	39
3.1.3. Προετοιμασία Ενσίρωματος ΥΑΕ.....	39
3.2 Σιτηρέσια προβάτων.....	40
4. Ομογενοποίηση Ιστών.....	42
5. Πειραματικά Πρωτόκολλα	42
5.1 Εκτίμηση Ολικού Πρωτεϊνικού Περιεχομένου – Μέθοδος Bradford.....	42
5.2 Μέτρηση του ενζύμου S – μεταφορά της Γλουταθειόνης (GST).....	43
5.3 Μέτρηση του ενζύμου Δισμουτάση του Σουπεροξειδίου (SOD).....	43
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
1. Μέτρηση Δραστικότητας GST.....	45
2. Μέτρηση Δραστικότητας SOD	49
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

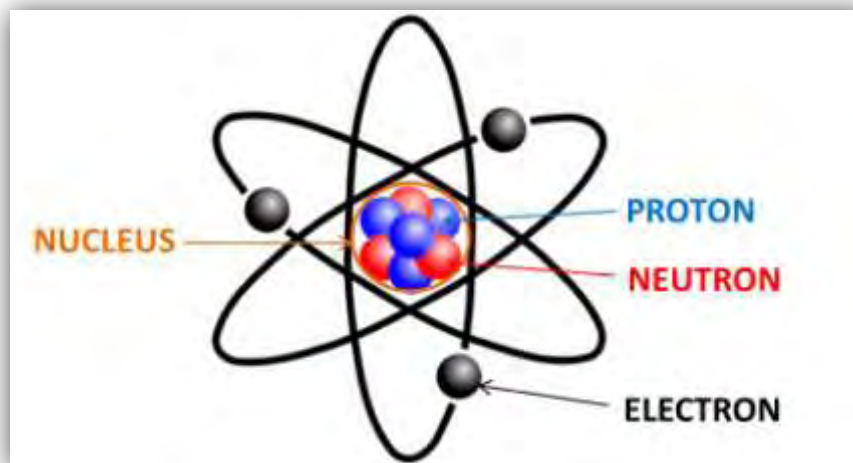
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικές Πληροφορίες

1.1 Φύση ατόμων

Γενικά στη φύση, όλα τα άτομα, εκτός του "πρώτιου" που είναι ισότοπο του χημικού στοιχείου "υδρογόνο" και δεν έχει νετρόνια, αποτελούνται από τρεις τύπους υποατομικών σωματιδίων τα οποία διέπουν τις ιδιότητες των πρώτων:

- **ηλεκτρόνια**, τα οποία έχουν αρνητικό φορτίο και έχουν τη μικρότερη μάζα
- **πρωτόνια**, τα οποία έχουν θετικό φορτίο και έχουν μάζα περίπου 1836 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων και
- **νετρόνια**, τα οποία δε φέρουν φορτίο και έχουν μάζα περίπου 1838 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1: Η δομή του ατόμου

Τα πρωτόνια και τα νετρόνια ονομάζονται νουκλεόνια και σχηματίζουν τον συμπαγή ατομικό πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια σχηματίζουν ηλεκτρονικό νέφος το οποίο περιβάλλει τον πυρήνα και είναι διευθετημένα σε ζεύγη σε έναν αριθμό τροχιακών που βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα.

Στην κβαντομηχανική εισάγονται τρεις κβαντικοί αριθμοί για τον καθορισμό της κατανομής αυτού του ηλεκτρονιακού νέφους. Οι κβαντικοί αυτοί αριθμοί προκύπτουν από την επίλυση της εξίσωσης Schrodinger και είναι:

- Ο κβαντικός αριθμός (n)
- Ο δευτερεύων αριθμός (l)
- Ο μαγνητικός κβαντικός αριθμός (m_l)
- Ο κβαντικός αριθμός του spin (m_s)

Κάθε δυνατή τριάδα κβαντικών αριθμών (n, l, m_l) οδηγεί σε μια λύση της εξίσωσης Schrodinger καθορίζοντας ένα συγκεκριμένο τροχιακό του ατόμου. Ο κβαντικός αριθμός του spin δεν συμμετέχει στον καθορισμό του ατομικού τροχιακού, ωστόσο καθορίζει την ιδιοπεριστροφή του ηλεκτρονίου που βρίσκεται σε κάθε ζεύγος. Σε κάθε τροχιακό δεν επιτρέπεται η ύπαρξη παραπάνω των δύο ηλεκτρονίων (ζεύγος) και γι' αυτό τα ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ηλεκτρόνια σθένους, δηλαδή τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε εξωτερικά τροχιακά, αποτελούν το κλειδί της χημικής συμπεριφοράς των στοιχείων. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν όμως ένα ή και περισσότερα ηλεκτρόνια είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές και εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν τα άτομα ή μόρια δεν διαθέτουν τέτοια ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ονομάζονται διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να ελκύει ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτές αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (redox) και κατά την οξείδωση παρατηρείται απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή παρατηρείται λήψη ηλεκτρονίων από ένα άτομο (π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).

1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Κάθε είδος ατόμου (όπως οξυγόνο ή άζωτο), μορίου ή ιόντος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα το οποίο είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια ονομάζεται Ελεύθερη Ρίζα ^{1,2} (Gilbert, 2000).

Για παράδειγμα, όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός, δηλαδή όταν διασπάται ένα ζεύγος ηλεκτρονίων το οποίο μοιράζονται δύο άτομα, ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε άτομο με αποτέλεσμα να σχηματίζονται άτομα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, δηλαδή ελεύθερες ρίζες που είναι πολύ δραστικές. Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια με αποτέλεσμα την εκ νέου δημιουργία ελευθέρων ριζών. Κατά συνέπεια, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης¹. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του μέσου που τις περιβάλλει. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους ³:

1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^\bullet$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^\bullet$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (triplet state) και συμβολίζεται με 3O_2 , δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό. Μπορεί, ωστόσο, να

ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (singlet state) και συμβολίζεται με $^1\text{O}_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου-ΔΜΟ

2.1 Γενικές Πληροφορίες για τις ΔΜΟ

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΜΟ). Οι κυριότερες ΔΜΟ είναι: η ρίζα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}), η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}), το O_2 απλής κατάστασης, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Στα δραστικά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται, επίσης, και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\bullet}), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

Γενικά, οι ΔΜΟ μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες⁴⁻⁷:

1. τις ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}),
2. τα ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως (HClO),
3. τους συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και
4. τα μόρια μη ρίζες (non-radicals), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).

2.2 Τρόποι Δημιουργίας Δραστικών Μορφών Οξυγόνου στον Οργανισμό

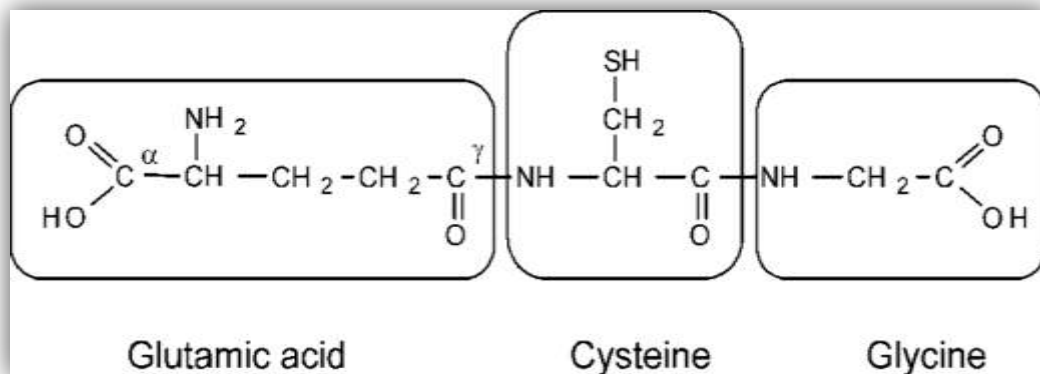
Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται σε κάθε οργανισμό είτε από φυσιολογικές διαδικασίες είτε από εξωτερικές πηγές.

Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

1. 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 ανάγοντας το σε σουπεροξείδιο.
2. Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων. Για παράδειγμα, ποικίλα ένζυμα μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450.
3. Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.
4. 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 βρεθεί εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια τα κύτταρα.
5. Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του οργανισμού μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με αυτόν. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξείδια).

2.3 Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες

Γενικά, σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας αυτής⁸. Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Γενικότερα, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβη σε όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Χημικά, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται είτε με την αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ είτε με τη μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).



Εικόνα 2: Δομή της γλουταθειόνης (GSH)

2.4 Αντιοξειδωτική Άμυνα - Αντιοξειδωτικές Ουσίες

Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΜΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο κάθε οργανισμός έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος και αντιοξειδωτικές ουσίες.

Ως **αντιοξειδωτική ουσία** χαρακτηρίζεται 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. Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

1. Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΜΟ,
2. Είτε 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 ισχύει ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση. Έτσι υπάρχουν:

- Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ουσίες:
 1. Μεγάλου μοριακού βάρους (ΜΒ). Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα, όπως η **δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)**, η **καταλάση (CAT)**, η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH)**, **συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (g-GCS)**, η **τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)**, η **παραοξονάση** και το **πρωτεάσωμα** τα οποία ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΜΟ μέσω της απομάκρυνσης δυνητικών οξειδωτικών ή μετατρέποντας ΔΜΟ σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις. Επίσης, στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα) όπως η **αλβουμίνη**, η **σερουλοπλασμίνη**, η **τρανσφερίνη** και η **ατογλοβίνη**, οι οποίες δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα.

2. Μικρού ΜΒ. Τα μικρού ΜΒ ενδογενή αντιοξειδωτικά υποδιαιρούνται περαιτέρω σε λιποδιαλυτά, αντιοξειδωτικά, μικρά χημικά μόρια, όπως η τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε), τα καροτενοειδή, η χολερυθρίνη, ορισμένες κινόνες και πολυφαινόλες και σε υδατοδιαλυτά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ και ορισμένες πολυφαινόλες.
- Αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός μέσω της τροφή. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις).

Ως **περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών** χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες Α, D και Ε, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή είναι εν δυνάμει **περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών** και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

2.5 Ένζυμα με Αντιοξειδωτική Δράση

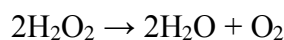
Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ΔΜΟ. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

- Η **δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)**, που καταλύει την αντίδραση:



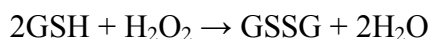
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν τρεις οικογένειες SOD: Η η κυτταροπλασματική SOD1, η μιτοχονδριακή SOD2 και η SOD3 η οποία εντοπίζεται εξωκυτταρικά. Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

- Η **καταλάση**, που καταλύει την αντίδραση:



Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα.

- Η **S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)**, η οποία είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού που δρα στη φάση II και καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξеноβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του
- Η **ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR)** που καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH)
- Η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)** που μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και καταλύει την αντίδραση:

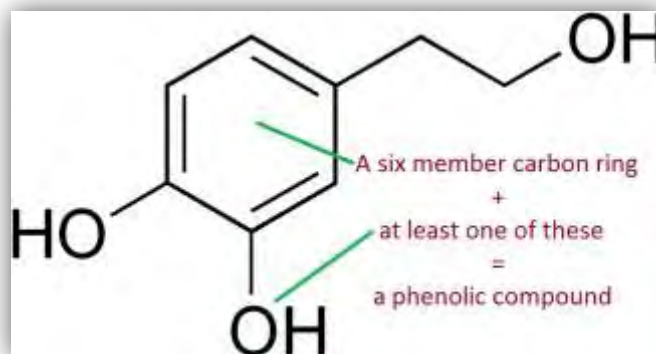


χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία οξειδώνεται. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο ⁹.

3. Πολυφαινόλες

3.1 Γενικές Πληροφορίες

Τα φυτά παράγουν μια μεγάλη ποικιλία από δευτερογενή προϊόντα που περιέχουν μια φαινολική ομάδα: μια λειτουργική υδροξυλομάδα πάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο.



Εικόνα 3: Η φαινολική ομάδα των πολυφαινολών

Αυτά τα προϊόντα ονομάζονται πολυφαινολικές ενώσεις. Οι πολυφαινόλες που έχουν φυτική προέλευση είναι μια χημικά ετερογενής ομάδα περίπου 10.000 ξεχωριστών ενώσεων από τις οποίες κάποιες είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, κάποιες είναι υδατοδιαλυτά καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες και άλλες είναι μεγάλα αδιάλυτα πολυμερή.

Σε συμφωνία με τη χημική τους ποικιλότητα, οι πολυφαινόλες έχουν ποικίλους ρόλους στα φυτά. Πολλές συμβάλουν στην άμυνα έναντι φυτοφάγων και παθογόνων οργανισμών, άλλες λαμβάνουν μέρος στη μηχανική υποστήριξη, στην προσέλκυση επικονιαστών και τη διασπορά των καρπών, στην απορρόφηση της επιβλαβούς υπεριώδους ακτινοβολίας ή και στη μείωση της αύξησης γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών.

Βέβαια, οι πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να βρεθούν και μέσα σε τρόφιμα που αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής ενός ανθρώπου. Σύμφωνα με αρκετές επιστημονικές μελέτες, βρέθηκε ότι κάποια τρόφιμα είναι πιο πλούσια σε πολυφαινόλες από τα υπόλοιπα. Αυτά είναι τα εξής ¹⁰:

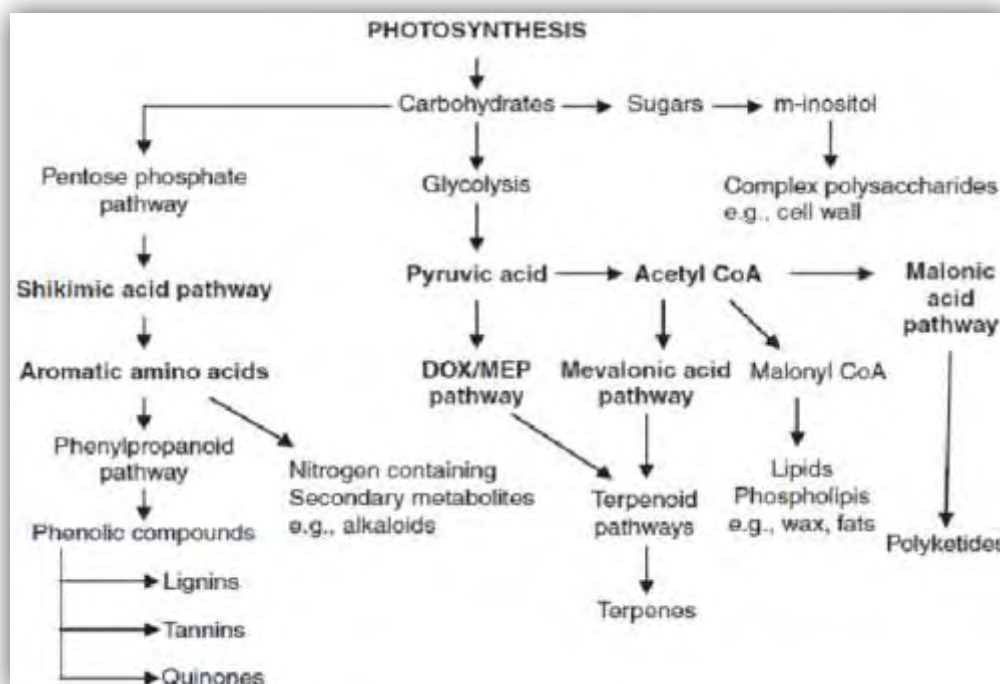
- Ροφήματα όπως Τσάι, Καφές και Κακάο
- Ελαιόλαδο

- Φρούτα όπως το μήλο, τα κεράσια, το ακτινίδιο, οι φράουλες, τα σταφύλια και ιδιαίτερα η φλούδα των σταφυλιών, το ρόδι, τα μούρα κ.α.
- Κρασί, ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί
- Προϊόντα ολικής αλέσεως όπως τα δημητριακά, βρώμη, ρύζι κ.α.
- Λαχανικά όπως το κόκκινο κρεμμύδι, το κόκκινο λάχανο, το μπρόκολο κ.α.
- Βότανα και μπαχαρικά,
- Ξηροί καρποί
- Φύκια

3.2 Βιοσύνθεση Πολυφαινολών

Η σύνθεση των πολυφαινολών γίνεται μέσω αρκετών διαφορετικών οδών και ως εκ τούτου, από μεταβολική άποψη, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα. Δύο είναι οι κύριες οδοί σύνθεσης των ενώσεων αυτών:

- Η οδός του σικιμικού οξέος, η οποία μετατρέπεις απλές πρόδρομες ενώσεις υδατανθρακών που προέρχονται από τη γλυκόλυση και την οδό των φωσφορικών πεντοζών σε τρία αρωματικά αμινοξέα: τη φαινυλαλανίνη, την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη. Οι περισσότερες ομάδες φαινολικών ενώσεων στα φυτά προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη μέσω της απομάκρυνσης ενός μορίου αμμωνίας για τον σχηματισμό του κινναμωνικού οξέος.
- Η οδός του μηλονικού οξέος, παρόλο που είναι σημαντική πηγή φαινολικών δευτερογενών προϊόντων στους μύκητες και στα βακτήρια, είναι μικρότερης σημασίας στα ανώτερα φυτά.



Εικόνα 4: Οι οδοί σύνθεσης των πολυφαινολών

3.3 Τάξεις Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες ¹¹, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδέονται στον δακτυλίους τους. Ως εκ τούτου, κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και τις μη φλαβονοειδείς ομάδες.

A. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες φυτικών φαινολικών ενώσεων. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών περιέχει 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μεταξύ τους με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Τα φλαβονοειδή κατατάσσονται πρωτίστως με βάση τον αριθμό οξείδωσης της γέφυρας αυτής. Έτσι, παραθέτονται παρακάτω οι τέσσερις κατηγορίες των φλαβονοειδών σύμφωνα με το κριτήριο αυτό:

1. Ανθοκυανίνες. Οι έγχρωμες αυτές χρωστικές των φυτών παρέχουν οπτικά σήματα που βοηθούν στην προσέλκυση επικονιαστών και διασπορέων των σπερμάτων. Οι

ανθοκυανίνες είναι γλυκοζίτες που περιέχουν διάφορα σάκχαρα στη θέση 3 και μερικές φορές και σε άλλες θέσεις και είναι υπεύθυνες για τα περισσότερα ερυθρά, ροδόχρωμα, ιώδη και κυανά χρώματα που παρατηρούνται σε άνθη και καρπούς.

2. Φλαβόνες. Γενικά, αυτά τα φλαβονοειδή απορροφούν φως με μικρότερο μήκος κύματος από αυτό που απορροφούν οι ανθοκυανίνες, οπότε δεν είναι ορατές από τον ανθρώπινο οφθαλμό. Όμως, σε έντομα που βλέπουν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος είναι πιθανόν οι φλαβόνες να λειτουργούν ως προσελκυστικά, οπτικά σήματα. Επιπλέον, οι φλαβόνες προστατεύουν τα κύτταρα από υψηλά επίπεδα UV-B ακτινοβολίας, επειδή συσσωρεύονται στα επιδερμικά στρώματα των φύλλων και των βλαστών και απορροφούν έντονα στην περιοχή της UV-B ακτινοβολίας, ενώ επιτρέπουν τη διέλευση της ορατής ακτινοβολίας.
3. Φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες είναι η τρίτη κατηγορία φλαβονοειδών και έχει δράση παρόμοια με εκείνη των φλαβονών, δηλαδή προσελκύουν έντομα επικονιαστές και προστατεύουν τα φυτικά κύτταρα από τη βλαπτική δράση της UV-B ακτινοβολίας.
4. Ισοφλαβόνες. Οι ισοφλαβόνες ή ισοφλαβονοειδή είναι η τελευταία κατηγορία φλαβονοειδών, στις οποίες η θέση ενός αρωματικού δακτυλίου έχει αλλάξει. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται κυρίως σε ψυχανθή και έχουν πολλές και διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Μερικά, όπως η ροτενόνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως εντομοκτόνα, δηλητήρια έναντι ζωικών οργανισμών και ως ιχθυοκτόνα. Άλλες ισοφλαβόνες έχουν αντι-οιστρογόνες επιδράσεις και κάποιες μπορεί, επίσης, να ευθύνονται για τις αντικαρκινικές ιδιότητες των τροφών που παρασκευάζονται από τη σόγια. Τα τελευταία χρόνια, οι ισοφλαβόνες έγιναν περισσότερο γνωστές για τον ρόλο τους ως *φυτοαλεξίνες*, οι οποίες είναι αντιμικροβιακές ενώσεις που συντίθενται ως απόκριση σε βακτηριακές και μυκητιακές μολύνσεις και βοηθούν στον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου εισβολέα.

B. Μη φλαβονοειδή

Οι μη φλαβονοειδής ενώσεις περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τις λιγνάνες και τα στυλβένια.

1. **Φαινολικά Οξέα:** Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και σε παράγωγα του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) ¹². Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντικικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ.
2. **Λιγνάνες:** Μετά την κυτταρίνη, η περισσότερο διαδεδομένη οργανική ένωση στα φυτά είναι η λιγνίνη, ένα έντονα διακλαδισμένο πολυμερές αποτελούμενο από φαινυλοπροπανοειδείς ενώσεις. Η λιγνίνη βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα ποικίλων τύπων κυττάρων όπου και προσφέρει μηχανική υποστήριξη. Εκτός από αυτό, η σκληρότητα της απωθεί φυτοφάγους οργανισμούς και η χημική της σταθερότητα την κάνει σχετικά δύσπεπτη, δηλαδή ως μόριο παρέχει σημαντικές προστατευτικές λειτουργίες στα φυτά.
3. **Στιλβένια:** Το πιο γνωστό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυτοαλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων.

3.4 Επίδραση των Πολυφαινολών στην υγεία

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες οι πολυφαινολικές ενώσεις δείχνουν να επιδρούν ευεργετικά στον ανθρώπινο οργανισμό έχοντας αντιφλεγμονώδη δράση, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιαλλεργικές ιδιότητες και συμβάλλοντας στην πέψη των θρεπτικών συστατικών. Τέλος, μειώνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς βοηθούν στη μείωση εμφάνισης πολλών παραγόντων που τα προκαλούν, όπως η χοληστερίνη, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση.

Μία πολύ σημαντική δράση των πολυφαινολών είναι η αντιοξειδωτική. Πιο συχνά οι πολυφαινόλες δρουν με τους παρακάτω τρόπους:

- Ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές).
- Ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξείδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές $OH\cdot$.

- Ως συν-αντιοξειδωτικά, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά.

4. Η Ελιά και οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου

4.1 Η Ελιά

Η ελιά (*Olea europaea*) είναι ένα αειθαλές δέντρο της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*) που ευδοκίμει στη Μεσόγειο, την Ασία και την Αφρική. Δεν υπερβαίνει τα 8- 15 μέτρα σε ύψος. Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω. Τα άνθη της είναι λευκωπά, μονοπέταλα και πολύ μικρά, σχηματίζουν ταξιανθία βότρυος και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό.



Εικόνα 5: Η ελιά

Η ελιά υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς. Είναι γνωστή από τους αρχαιότετους χρόνους, και πιθανότατα κατάγεται από το χώρο της ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την Αθηνά στην Ακρόπολη. Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιέργησε την ελιά στον ευρωπαϊκό μεσογειακό χώρο. Την μετέφεραν είτε Έλληνες άποικοι είτε Φοίνικες έμποροι. Η ελιά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην διατροφή, όσο και στην ιατρική. Ο καρπός της είναι πολύ βασικός για την

Μεσογειακή διατροφή τόσο ως εδώδιμος όσο και ως ελαιόλαδο. Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιόλαδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ήδη από την ιστορία πολλοί αναγνώρισαν την αξία του. Ο Αριστοτέλης μελέτησε την ελιά και ο Σόλων νομοθέτησε την προστασία της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο Όμηρος που παρομοίασε με χρυσό υγρό. Ο Ιπποκράτης στις εργασίες του αναφέρει πάνω από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιόλαδου. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν το εκχύλισμα από τα φύλλα της ελιάς για την διατήρηση του σώματος των νεκρών, αφού παρεμπόδιζε την ανάπτυξη μικροοργανισμών που καταστρέφουν τις σάρκες.

4.2 Η συγκομιδή της ελιάς

Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τέλη του φθινοπώρου, οπότε και ξεκινάει η συγκομιδή. Η ελιά παραδοσιακά μαζεύεται με το χέρι, και το μάζεμα της αποτελεί εδώ και αιώνες σημαντική αγροτική δραστηριότητα σε πολλές περιοχές της Μεσογείου. Τα κλαδιά περνιούνται με το "χτένι" για να αποσπαστεί ο καρπός με μεγαλύτερη ευκολία και ταχύτητα, ενώ το έδαφος κάτω από την ελιά στρώνεται με ελαιόπανα ή με ειδικό δίχτυ από συνθετικό υλικό. Σκάλες από ξύλο ή αλουμίνιο χρησιμοποιούνται για το μάζεμα των δυσπρόσιτων κλαδιών. Αφού πέσουν οι ελιές από το δέντρο, οι αγρότες τινάζουν τα άκρα των ελαιόπανων ώστε να δημιουργηθούν σωροί, οι οποίοι θα καθαριστούν με το χέρι από χοντρά κλαριά και τσαμπιά προκειμένου να τοποθετηθούν στη συνέχεια σε δοχεία μεταφοράς και σακιά και να μεταφερθούν στον χώρο αποθήκευσης. Η απομάκρυνση των φύλλων δεν είναι απαραίτητη, καθώς στο ελαιοτριβείο υπάρχει ειδικό μηχάνημα που τα απομακρύνει με αέρα. Εναλλακτικά, η ελιά τινάζεται με ξύλινα ραβδιά. Η τεχνική όμως αυτή μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν έχει ωριμάσει πλήρως ο καρπός και είναι εύκολη η απόσπασή του από το δέντρο. Σε μεγάλους ελαιώνες χρησιμοποιούνται συχνά ειδικά μηχανήματα για τη συγκομιδή.



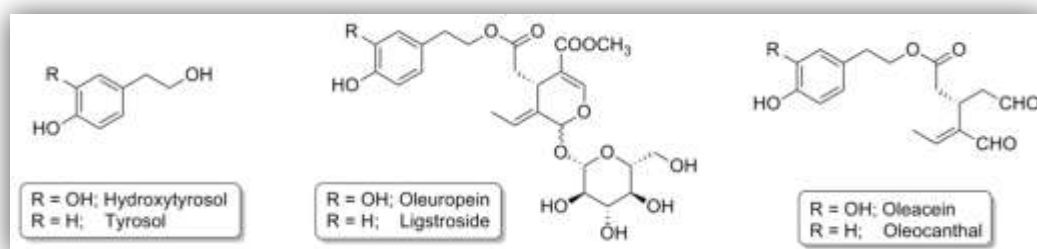
Εικόνα 6 : Η συγκομιδή της ελιάς

4.3 Οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου

4.3.1 Κύριες πολυφαινόλες του ελαιολάδου

Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου είναι ένα σύνολο απλών φαινολών και πολυφαινολών. Από διάφορους τύπους ελαιολάδου έχουν απομονωθεί περισσότερες από 20 φαινόλες. Οι πιο ευρέως διαδεδομένες είναι:

- Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη
- Κάποια οξέα όπως: το βανιλικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το ρ-κουμαρικό, το ο-κουμαρικό και το κινναμικό οξύ
- Η βανιλίνη, η ελαιασίνη, η ελευροπαΐνη
- Και διάφορες αγλυκόνες όπως η λιγκστροσίδη, η ελαιοκανθάλη και η λουτεολίνη



Εικόνα 7: Κύριες Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου

Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E) και του φυτικού λιπαρού οξέος, του ελαϊκού οξέος, εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και το οξειδωτικό στρες των αερόβιων οργανισμών ¹³. Οι πολυφαινόλες υπάρχουν στο ελαιόλαδο από την φύση ώστε να λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά και να προστατεύουν το ελαιόλαδο από το τάγγισμα, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας. Σημειώνεται, λοιπόν, ότι ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και άρα αντοχής στον χρόνο, ενώ ταυτόχρονα η κατανάλωσή του προστατεύει τα ζωικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Επίσης, οι ουσίες που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχουν καρδιοπροστατευτικό και νευροπροστατευτικό και επιδρούν στην οξειδωτική βλάβη των ερυθροκυττάρων ¹⁴⁻¹⁸

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

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

4.3.3 Προστατευτικός ρόλος πολυφαινολών από ΥΑΕ

Ιδιαίτερα για τις πολυφαινόλες οι οποίες βρίσκονται στο ελαιόλαδο και κατ' επέκταση στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχουν δείξει ότι τα πολυφαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου έχουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να μειώσουν αποτελέσματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών ¹⁶. Οι ωφέλιμες επιδράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου και των ΥΑΕ είναι οι εξής¹⁵:

- Στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Αυξημένα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (TC) και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL), έχουν καθιερωθεί ως παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, η οποία είναι η κύρια αιτία

της καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) πιστεύεται ότι έχουν προστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες^{15,19}.

- Στην οξείδωση των λιπιδίων. Η οξείδωση της LDL θεωρείται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου²⁰. Η οξείδωση της LDL προκαλεί βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα, διεγείροντας την πρόσληψη μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πλάκας εντός του αρτηριακού τοιχώματος^{21,22}. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (in vivo) έχουν δείξει ότι το επίπεδο στο οποίο η LDL οξειδώνεται, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης πολυφαινολών²³⁻²⁵.

- Στην οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η οξειδωτική βλάβη στο DNA είναι ένα πρόδρομο γεγονός για την ανθρώπινη καρκινογένεση και είναι γνωστό ότι ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν συνεχώς τα ανθρώπινα κύτταρα²⁶. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχειδειχθεί πως η πρόσληψη συστατικών ελαιόλαδου πλούσιο σε πολυφαινόλες μειώνει τις βλάβες στο DNA έως και 30% σε σύγκριση με πρόσληψη ελαιόλαδου φτωχού σε πολυφαινόλες²⁷.

- Σε δείκτες φλεγμονής. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής στον ορό σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η θρομβοξάνη B2 του πλάσματος (TXB2) και το λευκοτριένιο B4 (LTB4) είναι γνωστοί ως προφλεγμονώδεις παράγοντες. Η TXB2 έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων του αίματος και το LTB4 έχει χημειοστατική επίδραση επί των ουδετερόφιλων, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε κατεστραμμένο ιστό²⁸. Αυτοί οι παράγοντες είναι γνωστό ότι παράγουν τον πόνο, την ερυθρότητα και το οίδημα που σχετίζεται με φλεγμονή. Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε μία μείωση στις συγκεντρώσεις των TXB2 και LTB4 με αυξανόμενη συγκέντρωση πολυφαινολών του ελαιόλαδου^{29,30}.

- Στην κυτταρική λειτουργία. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η καταστολή του κυτταρικού θανάτου είναι βασικοί παράγοντες για το σχηματισμό όγκων και την εξέλιξη αυτών³¹. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φαινόλη του ελαιόλαδου

υδροξυτυροσόλη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα προ-μυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 και σε ανθρώπινες σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. Έρευνες δείχνουν ότι ο β υποδοχέας οιστρογόνου έχει μια προστατευτική επίδραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ο β υποδοχέας οιστρογόνου είναι ο κύριος υποδοχέας οιστρογόνου και εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο από την κανονική βλεννογόνο ανθρώπινου εντέρου. Σε ένα καρκινικό κόλον, ωστόσο, η έκφραση του β υποδοχέα οιστρογόνου μειώνεται και συνδέεται με την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλούν οι πολυφαινόλες του παρθένου ελαιόλαδου, οι οποίες δρουν σαν αντικαρκινικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι περισσότερες φαινόλες έχουν χημική δομή παρόμοια με αυτήν της 17 βοιστραδιόλης (κύρια μορφή του οιστρογόνου στον άνθρωπο) και μπορούν να είναι προστατευτικές έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου ενεργώντας ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνου.

- Στη μικροβιακή δραστηριότητα. In vitro έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις στο λάδι, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ιδιαίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη έχουν δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση εναντίων πολλών στελεχών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για εντερικές και αναπνευστικές λοιμώξεις³².

5. Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Αρχικά, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα ΥΑΕ παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της ελιάς. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο, παράγεται και μία σειρά υποπροϊόντων. Αυτά είναι:

- ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού),
- τα ελαιόφυλλα, που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιόκαρπο και

- μία σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων, που είναι γνωστά ως "λιοζούμι", "κατσίγαρος" ή "μούργα".

Ο κατσίγαρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο. Πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολύ-αλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η άμεση επίπτωση του κατσίγαρου στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει ευτροφικά φαινόμενα σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους και λίμνες). Τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων (ΥΑΕ), αν και υποπροϊόντα επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, συγκαταλέγονται βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο, παράγει περίπου 1.000 tn. απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιοκάρπου, με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων.

Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο, ο οποίο δεν βιοαποικοδομείται εύκολα αφού αποτελείται από ενώσεις άμεσα και δύσκολα διασπώμενες
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l), οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν σημαντική επιβάρυνση στους αποδέκτες που διατίθενται
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία
- Μεγάλη συγκέντρωση σε ανόργανα συστατικά, όπως ενώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, νάτριο, κάλιο και σίδηρο, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στο περιβάλλον.^{16,33,34}

6. Βιολειτουργική Ζωοτροφή και Πρόβατα

6.1 Γενικές Πληροφορίες για τα Πρόβατα των Πειραμάτων

6.1.1 Χαρακτηριστικά

Για την διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικά μοντέλα πρόβατα. Ως εκ τούτου, στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποιες πληροφορίες όσον αφορά αυτά τα ζώα.

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries*), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας. Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι γύρω στο 40%. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο. Ανάλογα με την ηλικία και το φύλο τους, ονομάζονται *αρνιά* μέχρι δυο μηνών, *ζυγούρια* μέχρι ενός έτους, *κριάρια* τα ώριμα αρσενικά και *προβατίνες* τα θηλυκά. Έχουν μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα, απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκριζο. Ζουν 10 έως 14 χρόνια, ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσής τους. Τρέφονται με νωπά χόρτα, τα οποία καταπίνουν σχεδόν αμάσητα, ώστε να εξασφαλιστούν κατά τη διάρκεια της ημερήσιας βοσκής οι μεγάλες ποσότητες που απαιτούνται. Αργότερα, όταν αναπαύονται, η τροφή επανέρχεται στο στόμα και αναμασάται.

6.1.2 Εγκυμοσύνη

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

6.1.3 Χιώτικο πρόβατο

Το Χιώτικο πρόβατο, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, προήλθε από το ομώνυμο νησί της Χίου, στην περιοχή του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Αποτελεί διασταύρωση ομοιόμαλλου, λεπτόουρου, ελληνικού πρόβατου με παχύουρο, αναμικόμαλλου, μικρασιάτικου πρόβατου. Τελικά, κατατάσσεται στα ομοιόμαλλα, παχύουρα πρόβατα. Λέγεται ότι παλαιότερα κτηνοτρόφοι της νήσου Χίου και της Ανατολίας, περιοχής της Μικράς Ασίας προχώρησαν σε προσμίξεις μεταξύ των ντόπιων φυλών και των φυλών Kivircik και Daglic. Το Χιώτικο πρόβατο είναι σχετικά μεγαλόσωμο με σωματικό βάρος προβατίνων 45-65 κιλά (105-155 λίβρες) και κριαριών 65-85 κιλά (145-200 λίβρες). Θεωρείται η καλύτερη ελληνική φυλή λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής. Ο χρωματισμός του είναι λευκός με χαρακτηριστικές κηλίδες μαύρου χρώματος στο κεφάλι γύρω από τα αυτιά, τα μάτια, στην κοιλιά και στα πόδια. Τα αρσενικά διαθέτουν κέρατα με μεγάλη σπείρα ενώ τα θηλυκά, όταν έχουν κέρατα, είναι μικρά σαν ένα εξόγκωμα. Το Χιώτικο πρόβατο έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για τη γενετική βελτίωση άλλων ελληνικών και ξένων φυλών με πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και αμνοπαραγωγής.

6.2 Παραγωγή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών

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

Ως ζωοτροφή, ορίζεται κάθε ύλη η οποία μετά την πρόσληψή και την πέψη της μπορεί να απορροφηθεί και να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό του ζώου. Στην ηλικία απογαλακτισμού τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα ενήλικα. Ως αποτέλεσμα, θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση θρεπτικών βιοδραστικών συστατικών που θα έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγηση, λοιπόν, αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες³⁵.

Γενικά, πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν στραφεί τα τελευταία χρόνια στις ευεργετικές ιδιότητες των υποπροϊόντων της επεξεργασίας της ελιάς (Υ.Α.Ε), λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης η οποία βασίζεται κυρίως στην σημαντικά υψηλή περιεκτικότητα τους σε πολυφαινόλες όπως προαναφέρθηκε.

Με δεδομένα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, σχεδιάστηκε ένα πείραμα κατά το οποίο δημιουργείται μία βιολειτουργική ζωοτροφή με χρήση των πολυφαινόλων από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και εισάγεται στην καθημερινή διατροφή προβάτων και ειδικότερα σε πρόβατα που βρίσκονται στα πρώτα στάδια μετά την γέννησή τους, όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

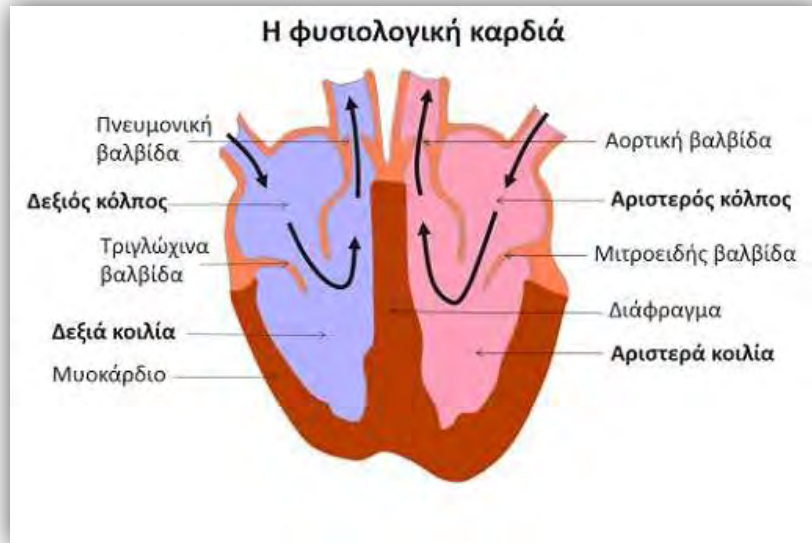
Η βιολειτουργική ζωοτροφή έχει ως σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες αλλά και τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και την αύξηση της παραγωγικότητάς τους. Τέλος, δεδομένου ότι τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου που παράγονται ως υποπροϊόντα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της ελιάς είναι ρυπογόνα, μέσω της εκμετάλλευσή τους για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών μπορούμε να μειώσουμε ταυτόχρονα και τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από αυτά.

7. Ιστοί που Μελετήθηκαν στο Πείραμα

Όπως προαναφέρθηκε στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου στον εγκεφαλικό, στον καρδιακό και στον ιστό του τετρακεφάλου νεαρών προβάτων. Οι ιστοί αυτοί είναι ζωτικής σημασίας για όλους τους οργανισμούς.

7.1 Καρδιά

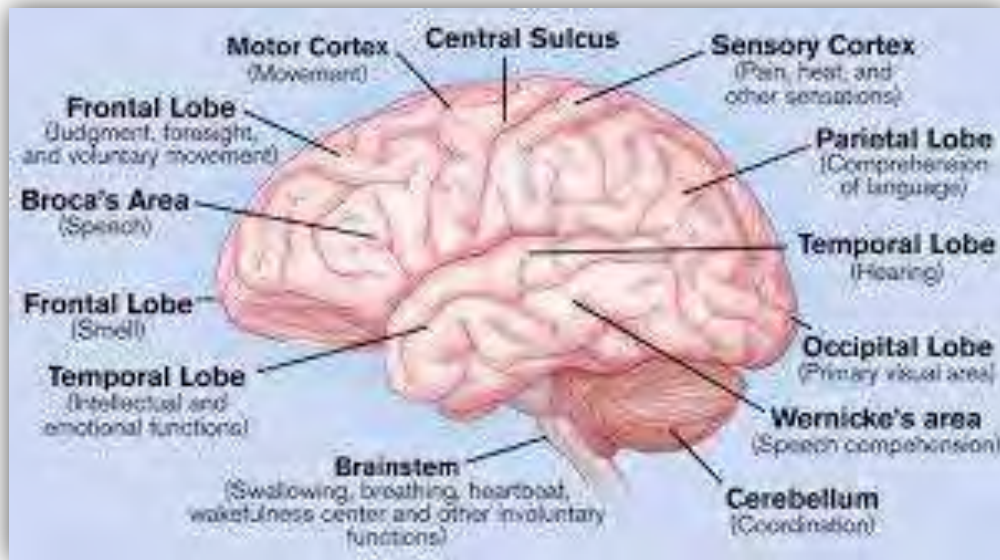
Η καρδιά είναι κοίλος μυς που δίνοντας στο αίμα πίεση, το κάνει να κυκλοφορεί στο εσωτερικό των αρτηριών, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φτάνει σε όλα τα όργανα. Είναι φυσική αντλία που παίρνει το αίμα από τις φλέβες, στις οποίες βρίσκεται σε χαμηλή πίεση και το στέλνει στις αρτηρίες με υψηλή. Η καρδιά αποτελείται από ένα ειδικό τύπο σκελετικού μυ που βρίσκεται μόνο σε αυτή και αποκαλείται καρδιακός μυς και αποτελεί το μυοκάρδιο. Η καρδιά εν γένει λειτουργεί ακατάπαυστα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού.



Εικόνα 8: Η ανθρώπινη καρδιά

7.2 Εγκέφαλος

Ο εγκέφαλος αποτελεί το σπουδαιότερο και μεγαλύτερο τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Βρίσκεται εντός του εγκεφαλικού κρανίου και περιβάλλεται από τρεις προστατευτικούς υμένες, τις μήνιγγες. Αποτελείται από δύο ημισφαίρια τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους από την επιμήκη σχισμή. Από την κάτω επιφάνεια του εγκεφάλου εκφύονται οι εγκεφαλικές συζυγίες ή νεύρα και ξεκινά ο νωτιαίος μυελός. Η βάση του εγκεφαλικού κρανίου έρχεται σε σχέση με την κάτω επιφάνεια του εγκεφάλου και διαθέτει αντίστοιχα τμήματα για την δίοδο των κρανιακών νεύρων και του νωτιαίου μυελού. Από τα τμήματα αυτά περνούν επίσης τα διάφορα αγγεία για την αιμάτωση του εγκεφάλου. Η άνω και οι πλάγιες επιφάνειες του εγκεφάλου αποτελούν τον εγκεφαλικό φλοιό και έρχονται σε σχέση με τον θόλο του κρανίου.

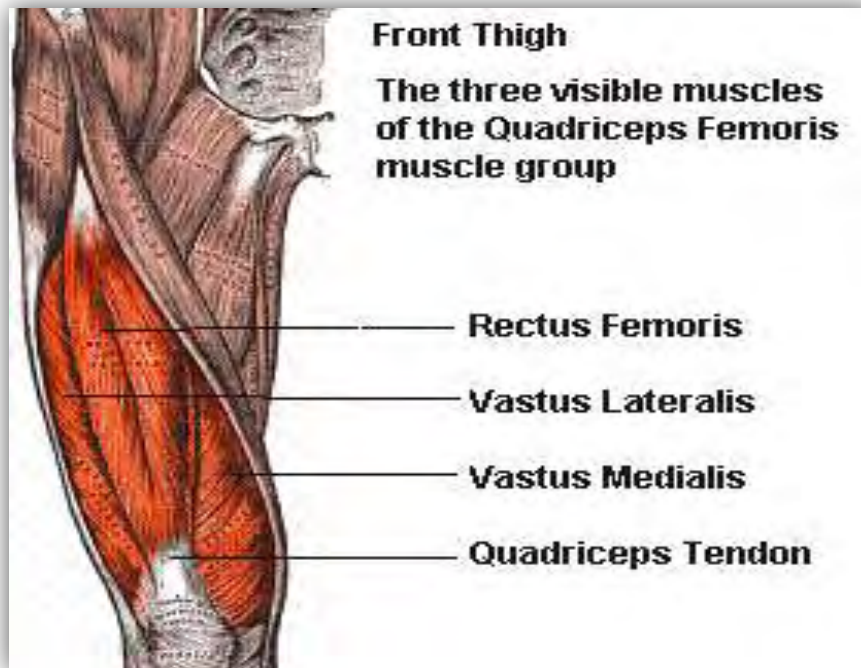


Εικόνα 9: Ο ανθρώπινος εγκέφαλος

7.3 Τετρακέφαλος Μυς

Ο τετρακέφαλος μηριαίος μυς είναι ένας μεγάλος μυς στο πρόσθιο διαμέρισμα του μηρού. Αποτελείται από τέσσερις μύες, τρεις πλατιοί μύες (έσω, μέσω και έξω πλατύς) και τον ορθό μηριαίο μυ. Ο τετρακέφαλος εκτείνει τη κνήμη στην άρθρωση του γονάτου, ενώ ο ορθός μηριαίος συμβάλλει στην κάμψη του μηρού στην άρθρωση του ισχίου. Οι πλατιοί μυς καταφύονται στην επιγονατίδα και στον τένοντα του τετρακέφαλου. Λόγω αυτής της θέσης καθλώνουν την επιγονατίδα στη θέση της κατά τη διάρκεια των κινήσεων. Ο τετρακέφαλος συνδέεται με την επιγονατίδα με τον τένοντα του τετρακέφαλου.

Ο τετρακέφαλος μυς νευρώνεται από το μηριαίο νεύρο, με ίνες που προέρχονται κυρίως από τα επίπεδα O3 και O4 του νωτιαίου μυελού. Επομένως, ο έλεγχος αντανακλαστικής διεγερσιμότητας αυτών των επιπέδων μπορεί να γίνει με ένα κτύπημα από το ειδικό σφυράκι στον επιγονατιδικό σύνδεσμο, ο οποίος συνδέει την επιγονατίδα με την κνήμη και αποτελεί συνέχεια του τένοντα του τετρακέφαλου.



Εικόνα 10: Ο τετρακέφαλος μυς του ανθρώπου

B. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στοχεύει στην αξιοποίηση των υγρών απόβλητων ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), για τη δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών υψηλής προστιθέμενης αξίας που θα χορηγηθούν σε πρόβατα νεαρής ηλικίας, με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους άμυνας και κατά συνέπεια την βελτιστοποίηση της ευζωίας τους και την αύξηση της ζωικής παραγωγής. Επιπλέον, η επεξεργασία των υγρών απόβλητων των ελαιοτριβείων, θα οδηγήσει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη εναπόθεσή τους και εξαιτίας των χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν .

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

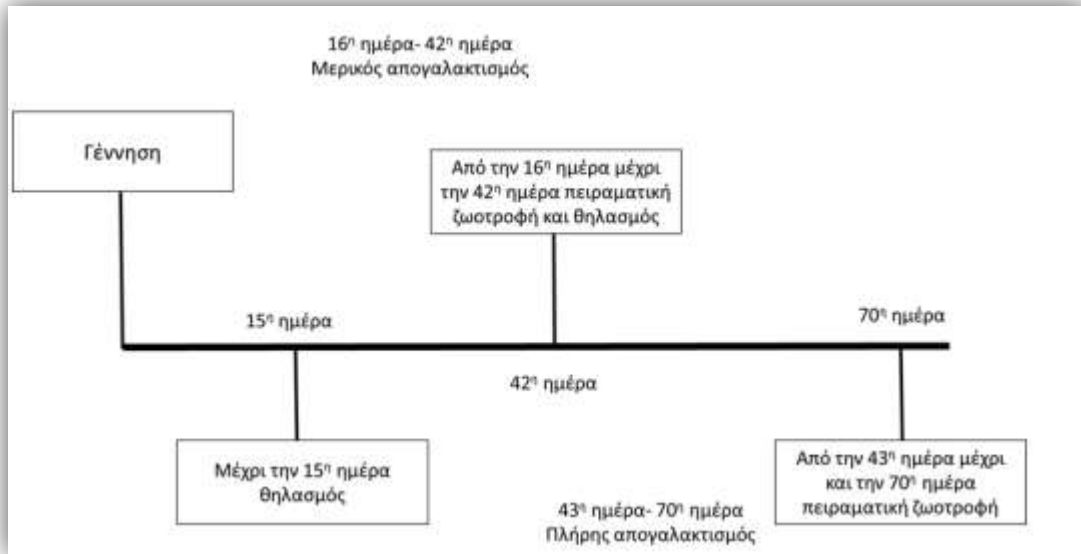
1. Γενικές Πληροφορίες

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

2. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τα πειράματα που ακολούθησαν εκτράφηκαν 24 πρόβατα. Τα πρόβατα επρόκειτο για αρνιά της «Χιώτικης» Ελληνικής φυλής τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, με 12 πρόβατα ανά ομάδα, σε ομαδικά κελιά. Εκεί είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (*Medicago sativa* - τριφύλλι). Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και λάμβανε σύνηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου. Τα πειραματικά σιτηρέσια ήταν ισοενεργά, ισοπρωτεϊνικά, και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων αμνών.

Μετά το πέρας των 15 ημερών από την γέννηση, δηλαδή στο διάστημα 15-42 ημερών, τα αρνιά θήλαζαν και ταυτόχρονα έτρωγαν τις δύο πειραματικές ζωοτροφές. Παράλληλα με τις πειραματικές ζωοτροφές και τον θηλασμό τα πρόβατα τρέφονταν με μηδική (τριφύλλι). Στο διάστημα μεταξύ των 42 και 70 ημερών, στο οποίο ολοκληρώθηκε ο πειραματισμός, έγινε ο πλήρης απογαλακτισμός όπου απομακρύνθηκαν οι μητέρες και τα πρόβατα τρέφονταν αποκλειστικά με τις πειραματικές ζωοτροφές καθώς και με μηδική τροφή. Κατά την εκτροφή των αμνών πραγματοποιήθηκε λήψη ιστών από την καρδιά, τον τετρακέφαλο μυ και τον εγκέφαλο στις 42 και 70 ημέρες.



Εικόνα 11: Σχεδιάγραμμα πειραματικής πορείας για την εκτροφή και απογαλακτισμό των αναπτυσσόμενων αρνιών

3. Βιολειτουργική Ζωοτροφή – Ενσίρωμα

3.1 Διαδικασία Ενσιρώματος

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.

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 οποία είναι παρόντα στην καλλιέργεια και εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες. Αυτά που είναι επιθυμητά και τα ανεπιθύμητα .

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

κατανεμημένα σε όλη την καλλιέργεια. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια οδηγεί σε ένα χαμηλό pH και 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.

3.1.1 Φάσεις ενσίρωσης

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. Μόλις η τροφή προς ενσίρωση έχει αποκλειστεί από τον αέρα, η διαδικασία ενσίρωσης μπορεί να διαιρεθεί σε 4 φάσεις:

Φάση 1η: Αερόβια Φάση - Η φάση αυτή συνήθως διαρκεί μόνο λίγες ώρες στις οποίες το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μεταξύ των σωματιδίων των φυτών μειώνεται, λόγω της αναπνοής του φυτικού υλικού αλλά και των αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών, όπως ζύμες και εντεροβακτήρια.

Φάση 2η: Φάση Ζύμωσης - Αυτή η φάση ξεκινά όταν η ενσίρωση γίνεται αναερόβια, και αυτό συνεχίζεται για αρκετές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες (pH = 3,8 - 5,0).

Φάση 3η: Σταθερή Φάση - Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φάσης 2 σιγά-σιγά μειώνονται σε αριθμούς.

Φάση 4η : Αερόβια Φάση Αλλοίωσης - Η φάση αυτή ξεκινά αμέσως μόλις το ενσίρωμα εκτεθεί στον αέρα.

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

3.1.2 Χαρακτηριστικά ενσίρωματος

Ένα καλό ενσίρωμα ΥΑΕ διαθέτει:

1. Ανοιχτό καφέ στο χρώμα
2. Έντονη γεύση
3. Μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα.
4. Πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια

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 σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί 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.

3.1.3. Προετοιμασία Ενσίρωματος ΥΑΕ

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

Για την υποβοήθηση της γαλακτικής ζύμωσης, χρησιμοποιήθηκε στάνταρ εμπορικό σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων που διαλυόταν σε νερό και μετά από μία διαδικασία αναγέννησης γινόταν η προσθήκη του στο υγρό που αναμιγνυόταν με το καλαμπόκι σε κάθε παρτίδα παραγωγής ενσίρωματος. Ζυγίζονταν 1 gr σκόνης λυοφιλιωμένων βακτηρίων για κάθε 100 κιλά τελικού ενσιρωμένου προϊόντος. Τα

βακτήρια αυτά στην συνέχεια διαλυόταν σε νερό βρύσης μέσω ανάδευσης και θέρμανσης στους 40°C σε αναλογία 1/10 w/v, με σκοπό να είναι πλήρως ενεργοποιημένα πριν από την προσθήκη τους στο υγρό της ενσίρωσης. Μετά την προσθήκη της καλλιέργειας και την ανάμιξη, το προς ενσίρωση μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδικές αεροστεγείς πλαστικές σακούλες, από τις οποίες τραβήχτηκε ο αέρας, μέσω μηχανήματος που δημιουργεί κενό και κλειστήκαν με θερμοσυγκόλληση αεροστεγώς με χρήση ειδικού μηχανήματος. Μετά την σφράγιση των σακουλών που περιείχαν το προς ενσίρωση υλικό, το υλικό που βρισκόταν υπό κενό άρχισε με την βοήθεια των λακτοβακίλλων που είχαν προστεθεί σ' αυτό να ζυμώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού οξέως και διοξειδίου του άνθρακα το οποίο διόγκωνε τις πλαστικές σακούλες. Για το λόγο αυτό και για να αποτραπεί η διάρρηξη των σακουλιών και η δημιουργία αερόβιων συνθηκών που δεν ευνοούν την γαλακτική ζύμωση, κάθε δύο με τρεις ημέρες το υλικό υφίστατο εκ νέου συσκευασία σε πλαστικές νέες πλαστικές σακούλες κατά τον ίδιο τρόπο και πάλι υπό κενό. Το pH των δύο τύπων ενσιρωμάτων A (Control) και B (Polyphenolic), μετρούνταν σε επίπεδο εβδομάδας μετά από 1:10 αραιώση του ενσιρώματος με απεσταγμένο νερό.

3.2 Σιτηρέσια προβάτων

Για το σκοπό της μελέτης παρασκευάστηκαν δύο είδη σιτηρεσίων, ένα κανονικό σιτηρέσιο για χορήγηση στην ομάδα ελέγχου-control (A) και σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με ενσίρωμα Υγρών Απόβλητων Ελαιολάδου (χορήγηση σε ομάδα B).

Η σύσταση του σιτηρεσίου για την ομάδα control (A) είναι: καλαμπόκι, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη, άλας ενώ για την ομάδα (B) χρησιμοποιήθηκε καλαμπόκι ενσιρωμένο με εκχύλισμα Υγρών Αποβλήτων Ελαιολάδου, γάλα φυράματος, σογιάλευρο, πίτυρα, ισορροπιστής αρνιών, μονοφωσφορικό ασβέστιο, μαρμαρόσκονη και άλας.

Τα σιτηρέσια ήταν ισοενεργειακά, ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων προβάτων. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

Σύσταση Σιτηρεσίου (%)	Ομάδα A- Control	Ομάδα B -YAE
Καρπός Αραβοσίτου	45	-
Ενσίρωμα αραβοσίτου και YAE	-	45
Πίτυρα Σίτου	9	9
Σογιάλευρο	21	21
Γάλα	20	20
Ισορροπιστής	2,5	2,5
Άλας	0,5	0,5
Μαρμαρόσκονη	1,2	1,2
Φωσφ, Μονοασβέστιο	0,8	0,8

Πίνακας 1: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα πρόβατα της ομάδας Α και Β, μέχρι τον απογαλακτισμό

Σύσταση Σιτηρεσίου (%)	Ομάδα A- Control	Ομάδα B -YAE
Καρπός Αραβοσίτου	45	-
Ενσίρωμα αραβοσίτου και YAE	-	45
Καρπός Σίτου	13	13
Πίτυρα Σίτου	15	15
Σογιάλευρο	18	18
Ηλιάλευρο	4	4
Ισορροπιστής	2,5	2,5
Άλας	0,5	0,5
Μαρμαρόσκονη	1,2	1,2
Φωσφ, Μονοασβέστιο	0,8	0,8

Πίνακας 2: Πειραματικό ΜΣΖ που χορηγήθηκε στα αναπτυσσόμενα πρόβατα της ομάδας Α και Β, μετά τον απογαλακτισμό

4. Ομογενοποίηση Ιστών

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε Phosphate buffer (0.1M, pH=7.4) στο οποίο είχε προστεθεί ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Roche Diagnostics GmbH). Το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για 10sec (5x) για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (10.000g, 15 min, 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε προσδιορισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω βιοχημική τους ανάλυση.

5. Πειραματικά Πρωτόκολλα

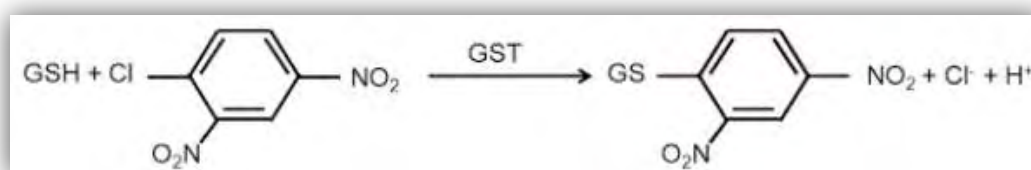
5.1 Εκτίμηση Ολικού Πρωτεϊνικού Περιεχομένου - Μέθοδος Bradford

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford
Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των ³⁶ πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm ³⁷. Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/ml. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20µL H₂O και 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της

συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20μL προστίθενται κάθε φορά σε 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

5.2 Μέτρηση του ενζύμου S - τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al³⁸.



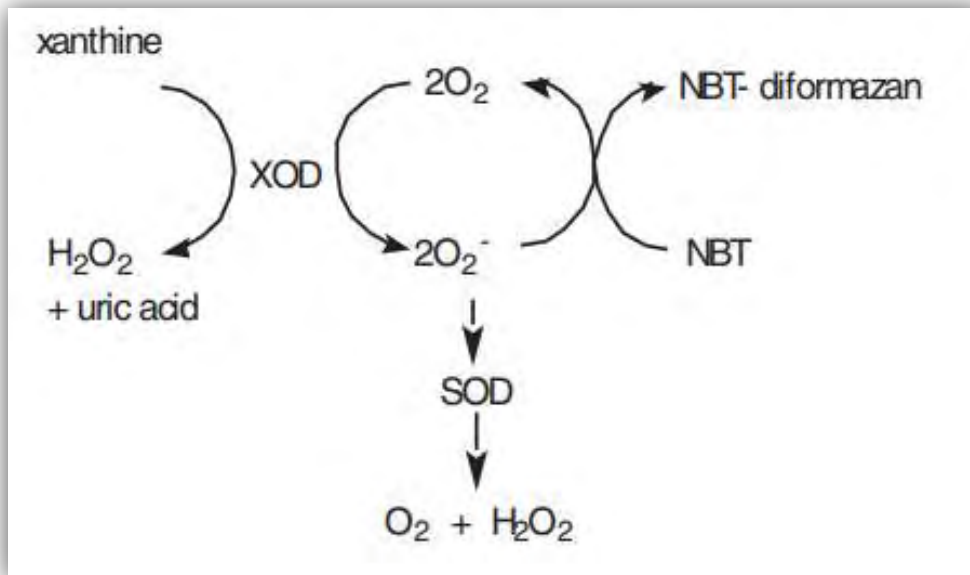
Εικόνα 12: Η αντίδραση της GSH με το CDNB

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100mM, pH 7.4) με 50μL GSH (1mM) και 20μL CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10μL του κυτοσολικού κυτταρόλυματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340nm για 3min. Εικόνα 10 Η αντίδραση της GSH με το CDNB. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλυμα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.

5.3 Μέτρηση του ενζύμου Δισμουτάση του Σουπεροξειδίου (SOD)

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberley & Spitz³⁹. Πιο αναλυτικά, 900μL SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2.24mM NBT; 10-4M ξανθίνη) αναμιγνύονται με ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια, σε 800μL SOD buffer προστίθενται 100μL

του ολικού κυτταρολύματος και ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3min στα 560nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.



Εικόνα 12: Η αντίδραση της SOD με το NBT

Η δραστηκότητα της SOD στα δείγματα των ιστών κανονικοποιήθηκε ως προς τη συνολική πρωτεΐνη, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μέτρηση Δραστικότητας GST

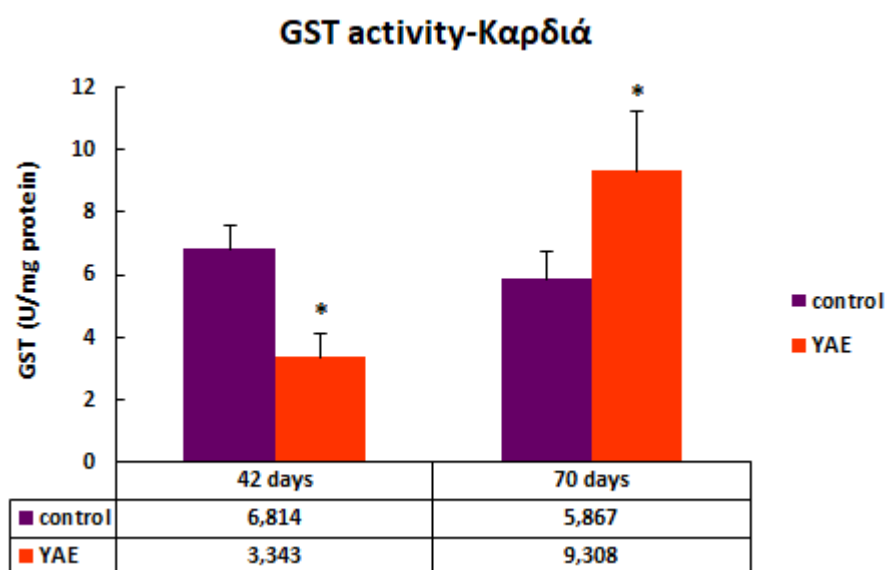
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των δύο ενζύμων για τους τρεις ιστούς των προβάτων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, (καρδιακός ιστός, ιστός εγκεφάλου και ιστός τετρακέφαλου μυ) φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται μεταξύ των δυο ομάδων (control και ΥΑΕ) κατά την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας της βιολειτουργικής ζωοτροφής.

Κατά τον προσδιορισμό της δραστικότητας της GST διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα δείγματα των 42 ημερών και αύξηση στις 70 ημέρες στον ιστό της καρδιάς. Παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αύξηση στις 70 ημέρες στον τετρακέφαλο μυ, ενώ στον ιστό του εγκεφάλου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Παρατηρήσεις

1. Καρδιακός ιστός

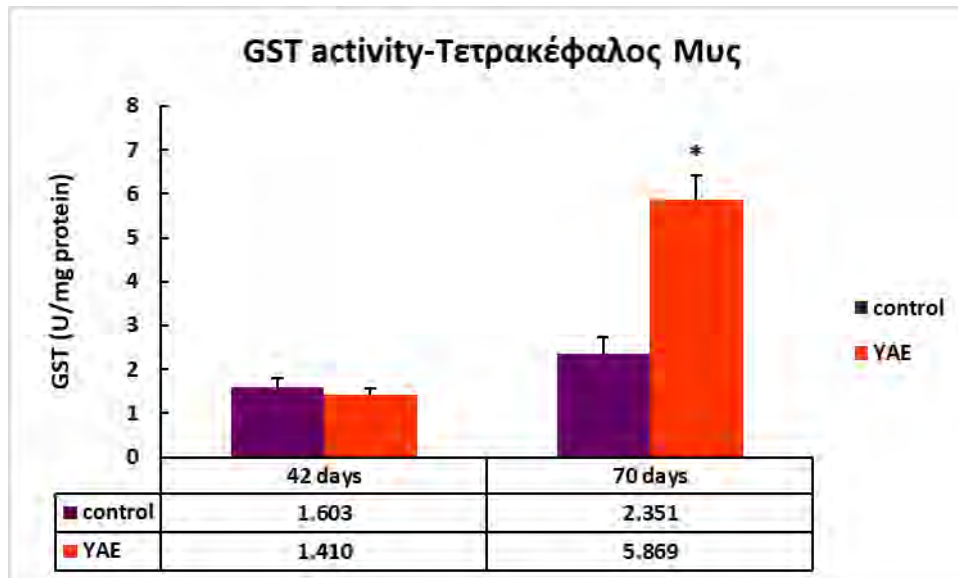
Στον καρδιακό ιστό, τα επίπεδα της GST, παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μείωση στις 42 ημέρες κατά 50,9% ενώ στις 70 ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση κατά 58,6%.



Διάγραμμα 1: Τα επίπεδα δραστηριότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και YAE στον καρδιακό ιστό κατά τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές $*p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

2. Τετρακέφαλος Μυς

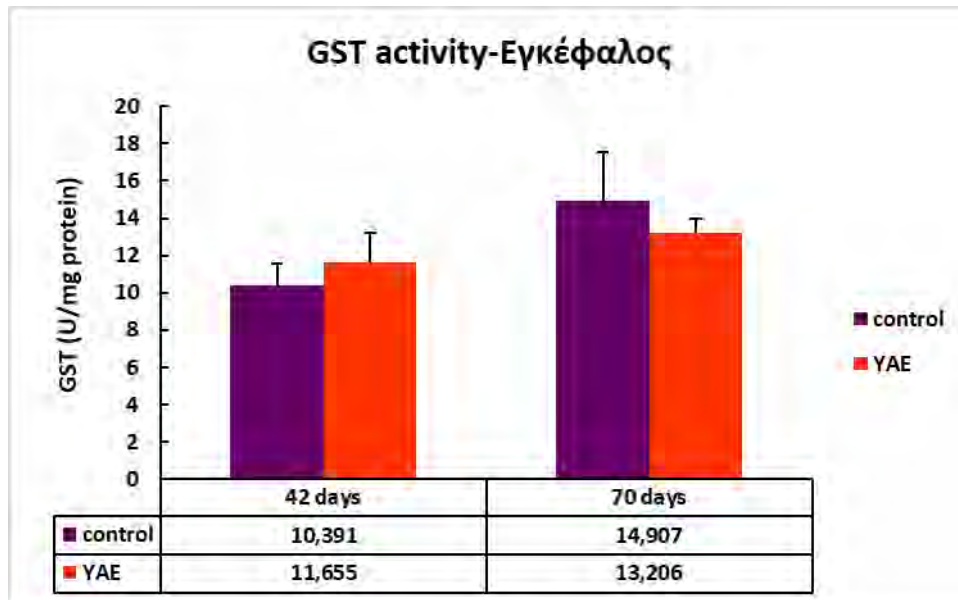
Στον τετρακέφαλο μυ, παρατηρήθηκε, επίσης, στατιστικώς σημαντική αύξηση μόνο στις 70 ημέρες κατά 149,7% στην ομάδα που λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ΥΑΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στις 42 ημέρες.



Διάγραμμα 2: Τα επίπεδα δραστικότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και ΥΑΕ στον τετρακέφαλο μυ. Οι Στατιστικά Σημαντικές τιμές $*p < 0.05$ ορίζονται σε σύγκριση με τις τιμές Control στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

3. Εγκέφαλος

Στο ιστό του εγκεφάλου, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ των δύο ομάδων σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (42 και 70 ημέρες).-



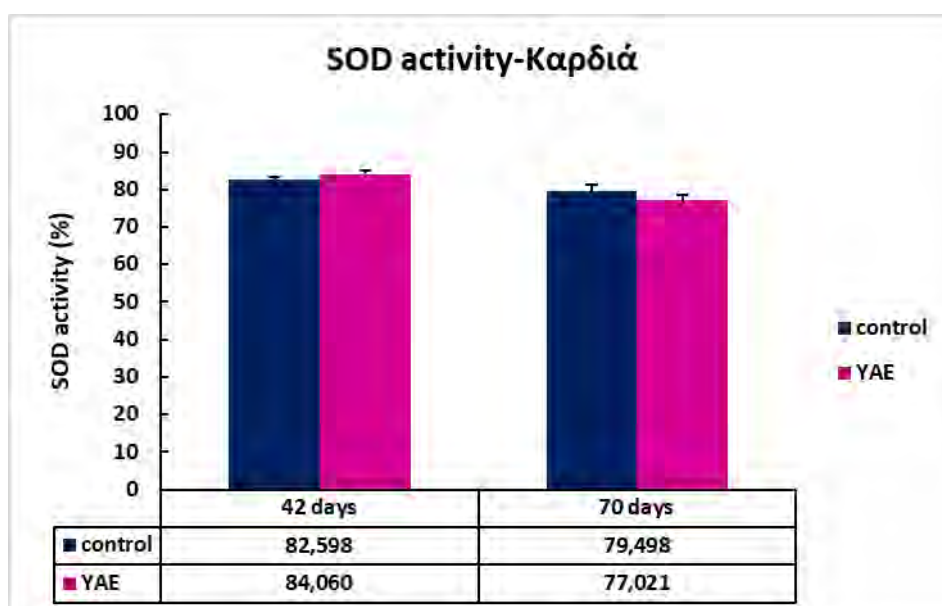
Διάγραμμα 3: Τα επίπεδα δραστικότητας της GST (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και YAE στον εγκέφαλο.

2. Μέτρηση Δραστικότητας SOD

Σε αντίθεση με το ένζυμο GST, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή στη δραστικότητα της SOD σε κανέναν από τους τρεις ιστούς (καρδιά, τετρακέφαλος μυς, εγκέφαλος) που εξετάστηκαν, σε καμία από τις δυο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας, μεταξύ των ομάδων control και YAE.

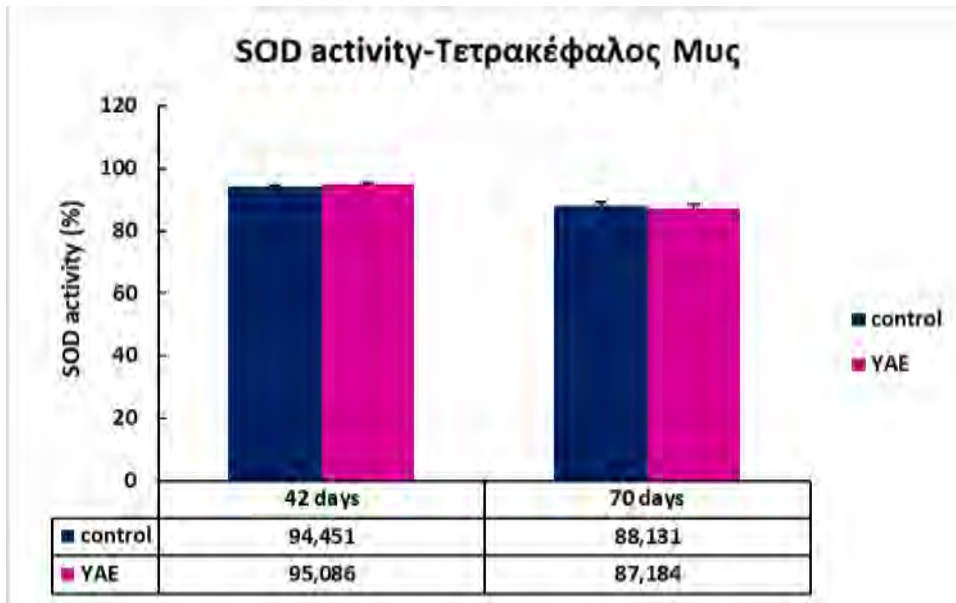
Παρατηρήσεις

1. Καρδιακός Ιστός



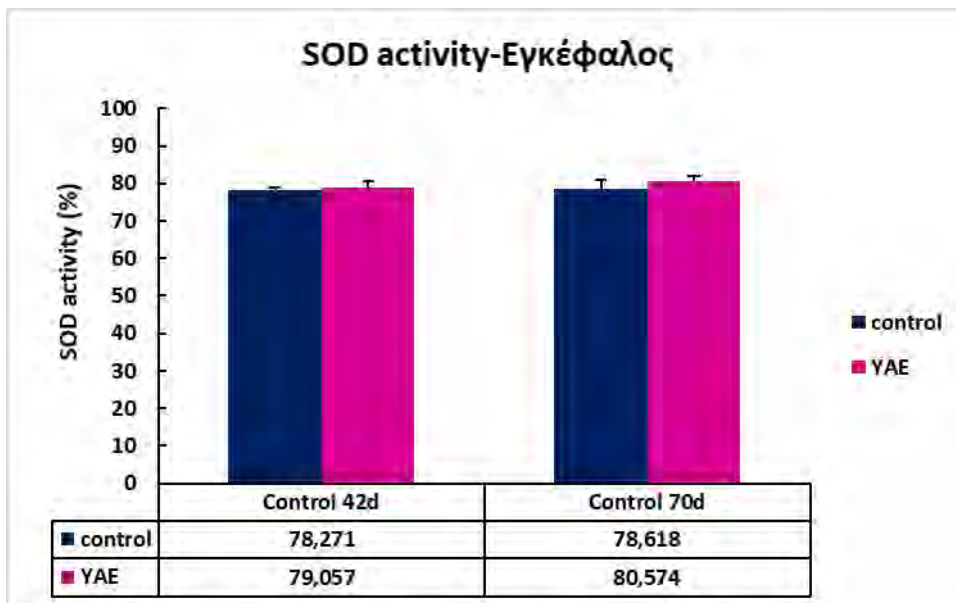
Διάγραμμα 4: Τα επίπεδα δραστικότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και YAE στον ιστό της καρδιάς.

2. Τετρακέφαλος Μυς



Διάγραμμα 5: Τα επίπεδα δραστηριότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και YAE στον τετρακέφαλο μυ.

3. Εγκέφαλος



Διάγραμμα 6: Τα επίπεδα δραστηριότητας της SOD (U/mg συνολικής πρωτεΐνης) των ομάδων control και YAE στον εγκέφαλο.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ελιά ή ελαιόδενδρο είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (Oleaceae), το οποίο συναντάται πολύ συχνά και στην Ελλάδα. Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαιότατους χρόνους, και πιθανότατα κατάγεται από το χώρο της ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την Θεά Αθηνά στην Ακρόπολη.

Ο καρπός της ελιάς είναι πολύ βασικός για τη Μεσογειακή διατροφή, τόσο ως εδώδιμος όσο και επειδή από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Επιπλέον, είναι θαυμάσια πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Η ελιά παρέχει φυτικές ίνες και μέταλλα στον οργανισμό και είναι πηγή της βιταμίνης E, που είναι φυσικό αντιοξειδωτικό. Θεωρείται επίσης ότι η βιταμίνη E, επιβραδύνει τις αλλοιώσεις των κυτταρικών μεμβρανών και καταπολεμά την οστεοπόρωση. Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιολάδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο Αριστοτέλης μελέτησε το ελαιόδεντρο και ανήγαγε την καλλιέργεια του σε επιστήμη. Ο Σόλων (639-559 π.Χ.) πρώτος νομοθέτησε την προστασία του. Ο Όμηρος το παρομοίασε με χρυσό υγρό. Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, το περιγράφει σαν το τέλειο θεραπευτικό. Στις διασωθείσες εργασίες του αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιολάδου. Αυτές περιλαμβάνουν δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους και της χολέρας, φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους. Ο Διοσκουρίδης ονομάζει το ελαιόλαδο προς την «εν υγεία χρήσιν άριστον». Αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητος και της άφθας. Αναφέρει επίσης ότι το ελαιόλαδο από τις άγριες ελιές είναι στυπτικό και ευεργετικό για τις κεφαλαλγίες.

Η σύγχρονη παραγωγή του ελαιολάδου περιλαμβάνει την χρήση ελαιουργείων. Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης στις ελαιοκομικές περιοχές αλλά και ένα σημαντικό πρόβλημα προς επίλυση για τη γεωργική βιομηχανία. Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από έντονα ιώδες- σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, πολύ έντονη οσμή ελαιόλαδου, πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο, υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα και μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδραση της ενσιρωμένης ζωοτροφής από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου σε 28 πρόβατα της Ελληνικής φυλής «Χιώτικα» τα οποία μέχρι τις 15 ημέρες από τη γέννησή τους, παρέμειναν με τις μητέρες τους για θηλασμό και στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο (2) ομάδες, Α και Β, σε ομαδικά κελιά. Είχαν ταυτόχρονη πρόσβαση σε πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) και μηδική (τριφύλλι), για κατανάλωση κατά βούληση. Η ομάδα Α αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, που λάμβανε σύνηθες σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ η ομάδα Β λάμβανε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με ενσίρωμα μείγματος αραβόσιτου και Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ), σε αντικατάσταση του καρπού αραβόσιτου.

Οι ιστοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν η καρδιά, ο εγκέφαλος και ο τετρακέφαλος μυς των νεαρών προβάτων. Μετρήθηκε η δραστικότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase-GST) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide dismutase-SOD). Τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II, όπως η GST, είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση ξενοβιοτικών ουσιών και δραστικών μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε κύτταρα και ιστούς⁴⁰. Τα ισόένζυμα της GST παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση διάφορων κατηγοριών ηλεκτρονιόφιλων, ιδιαίτερα αυτών που προκύπτουν από την ενεργοποίηση καρκινογόνων, καθώς και των ROS και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης⁴¹. Στην καρδιά, στις 42 ημέρες, στην ομάδα που λάμβανε τη ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με ΥΑΕ η δραστικότητα της GST μειώθηκε σημαντικά, ενώ στις 70 ημέρες αυξήθηκε. Στον τετρακέφαλο μυ, στις 42 ημέρες, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην δραστικότητα του ενζύμου ενώ στις 70 ημέρες αυξήθηκε. Τέλος, στον ιστό του εγκεφάλου δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στη δραστικότητα της GST. Ο εγκέφαλος δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε αντιοξειδωτικά ένζυμα. Περισσότερο εμπλουτισμένα είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα σε GSH, τα οποία έχουν και μεγαλύτερη δραστικότητα της SOD, γι' αυτό και η αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες στον εγκέφαλο έχει συσχετιστεί με τη χαμηλή δραστικότητα της γλουταθειόνης⁴².

Η SOD είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει τις ενδοκυτταρικές ρίζες σουπεροξειδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα απέναντι στο οξειδωτικό⁴³⁻⁴⁷.

Προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση της SOD, η οποία είναι παρούσα στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια, στο ολικό κυτταρόλυμα. Ως αποτέλεσμα, σε κανέναν από τους ιστούς, τόσο στις 42 ημέρες όσο και στις 70 ημέρες, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή.

Σε προηγούμενη μελέτη, δείχτηκε ότι η συμπλήρωση της τροφής με πολυφαινόλες από ΥΑΕ ενίσχυσε τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και τη μείωση της ζημιάς που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, σε κοτόπουλα⁴⁸. Επιπλέον, όπως είναι γνωστό, το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για διάφορες ασθένειες στα αγροτικά ζώα, όπως είναι και οι αμνοί που μελετήθηκαν σε αυτό το πείραμα³⁵.

Εκτός από αυτό, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου σε αμνούς τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα του ενζύμου GSH αυξήθηκαν σημαντικά στους ιστούς του σπλήνα και του εγκεφάλου την 42η ημέρα μετά τη γέννηση και στους ιστούς της καρδιάς, του σπλήνα, του τετρακέφαλο μυϊκό ιστό και του εγκεφάλου την 70η ημέρα μετά τη γέννηση καθώς και σε ερυθροκύτταρα και στους δύο χρόνους δειγματοληψίας στην ομάδα ΥΑΕ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου⁴⁹. Παρομοίως, μια άλλη μελέτη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου έδειξε ότι η χορήγηση τροφής ενισχυμένης με πολυφαινόλες από ΥΑΕ σε χοιρίδια και κοτόπουλα αύξησε τα επίπεδα GSH σε ερυθροκύτταρα και άλλους ιστούς^{48,50}

Τα αποτελέσματα αυτά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορούν να μας δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της αντιοξειδωτικής κατάστασης των αμνών. Στους περισσότερους ιστούς (σπλήνας, τετρακέφαλος μυς, καρδιά, ήπαρ), στις 70 ημέρες τα αυξημένα επίπεδα της GST σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα της GSH υποδηλώνουν αυξημένη ικανότητα αποτοξίνωσης του ζώου και καλύτερη προστασία του.⁵¹

Ωστόσο, η παρατηρούμενη αύξηση της δραστηριότητας της GST θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της GSH επίπεδα λόγω της σύζευξης του σε ηλεκτρονιόφιλα⁵¹. Ένας πιθανός μηχανισμός που μπορεί, επίσης, να οδηγήσει στην ενεργοποίηση της GST είναι η οδός σηματοδότησης του πυρηνικού παράγοντα 2 (Nrf2), ενός από τους σημαντικότερους αμυντικούς μηχανισμούς κατά του οξειδωτικού στρες.⁵²

Καταλήγοντας, οι ζωοτροφές εμπλουτισμένες με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση που βελτιώνει το αντιοξειδωτικό προφίλ των προβάτων ενισχύοντας την άμυνα τους έναντι σε οξειδωτικούς παράγοντες που ευθύνονται για διάφορες ασθένειες που μπορούν να μειώσουν την ποιότητα ζωής τους³⁵. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι παράλληλα με την βελτίωση του αντιοξειδωτικού προφίλ των προβάτων επιτυγχάνεται η αξιοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου. Η επεξεργασία τους μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται απ' την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.
2. Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology. A festschrift in honor of Daniel L. Gilbert. Symposium proceedings. Bethesda, Maryland, USA. July 2, 1998. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:1-426.
3. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem.* 2002;383(3-4):375-388. doi:10.1515/BC.2002.042
4. Aqil F, Gupta A, Munagala R, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutr Cancer.* 2012;64(3):428-438. doi:10.1080/01635581.2012.657766
5. Weisburger JH. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(10):891-897.
6. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
7. Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition.* 1999;15(6):523-526.
8. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991;91(3C):31S-38S.
9. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(9):1260-1267.
10. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences.* 2010;11(4):1321-1342. doi:10.3390/ijms11041321

11. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):326S-329.
12. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-747.
13. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(1):60-64.
doi:10.1006/bbrc.1998.8735
14. Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, et al. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(5):609-616.
doi:10.1002/mnfr.200800276
15. Castaner O, Fito M, Lopez-Sabater MC, et al. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2011;30(4):490-493. doi:10.1016/j.clnu.2011.01.013
16. Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RSJ. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009;49(3):218-236.
doi:10.1080/10408390701856223
17. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, et al. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev.* 2013;22(1):90-95. doi:10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7
18. Kalogerakis N, Politi M, Foteinis S, Chatzisyneon E, Mantzavinos D. Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J Environ Manage.* 2013;128:749-758. doi:10.1016/j.jenvman.2013.06.027
19. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med.* 1981;141(9):1128-1131.
20. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England).* 1994;344(8925):793-795.
21. Fito M, Cladellas M, de la Torre R, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil

- in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*. 2005;181(1):149-158. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.036
22. Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55(5):334-341. doi:10.1038/sj.ejcn.1601161
 23. Covas M-I, Nyyssonen K, Poulsen HE, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145(5):333-341.
 24. Ramirez-Tortosa C, Lopez-Pedrosa JM, Suarez A, Ros E, Mataix J, Gil A. Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br J Nutr*. 1999;82(1):31-39.
 25. Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, et al. Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann Nutr Metab*. 1998;42(5):251-260.
 26. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003;17(10):1195-1214. doi:10.1096/fj.02-0752rev
 27. Salvini S, Sera F, Caruso D, et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*. 2006;95(4):742-751.
 28. Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*. 2007;190(1):181-186. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.011
 29. Visioli F, Caruso D, Grande S, et al. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*. 2005;44(2):121-127. doi:10.1007/s00394-004-0504-0
 30. Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, et al. Olive oils high in phenolic

- compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr.* 2004;134(9):2314-2321.
31. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):342-348. doi:10.1038/35077213
 32. Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.* 2006;54(14):4954-4961. doi:10.1021/jf0602267
 33. Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sanchez J, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2013;61(22):5179-5188. doi:10.1021/jf400806z
 34. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-1246. doi:10.3390/nu2121231
 35. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007;173(3):502-511. doi:10.1016/j.tvjl.2006.06.005
 36. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):53-67.
 37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
 38. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
 39. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984;105:457-464.
 40. Yang YM, Noh K, Han CY, Kim SG. Transactivation of genes encoding for

- phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules*. 2010;15(9):6332-6348. doi:10.3390/molecules15096332
41. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*. 2001;20(6):591-598.
 42. Ikeda T, Choi BH, Yee S, Murata Y, Quilligan EJ. Oxidative stress, brain white matter damage and intrauterine asphyxia in fetal lambs. *Int J Dev Neurosci*. 1999;17(1):1-14.
 43. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*. 2002;1(2):117-123.
 44. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):280-285. doi:10.1042/
 45. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988;5(3):156-170.
 46. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-358.
 47. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:395-396.
 48. Gerasopoulos K, Stagos D, Kokkas S, et al. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem Toxicol*. 2015;82:42-49. doi:10.1016/j.fct.2015.04.021
 49. Makri S, Kafantaris I, Savva S, et al. Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs. *In Vivo*. 2018;32(2):291-302.
 50. Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, et al. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:319-327. doi:10.1016/j.fct.2015.11.007

51. Kerasiotti E, Terzopoulou Z, Komini O, et al. Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Reports*. 2017;4:364-372.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.06.007>
52. Nakagami Y. Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7469326. doi:10.1155/2016/7469326