



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΑΠΟ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ, ΣΠΛΗΝΑ ΚΑΙ ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΝΕΑΡΩΝ ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ
ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΜΕ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ

Assessment of oxidative stress in lungs, spleen and pancreas tissues of pigs
after the administration of fodder enriched with polyphenolic extracts from
olive mill waste waters



ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΠΗΝΕΛΟΠΗ
ΛΑΡΙΣΑ 2018-2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις, καθώς και για την όλη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας που με δέχτηκε στο εργαστήριο και δούλεψα με την ομάδα του εργαστηρίου για να φέρω εις πέρας την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον διδάκτορα κύριο Κωνσταντίνο Γερασόπουλο για την πολύτιμη καθοδήγηση και συνεισφορά.

Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εκτροφή στο στάδιο του απογαλακτισμού δεκαεννέα 19 χοιριδίων, της φυλής Landrace × Large White - Duroc - Pietrain, με πολυφαινολικά πρόσθετα από επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Υ.Α.Ε) και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους δράσης σε ιστούς από πνεύμονα, πάγκρεας και σπλήνα.

Τα δεκαεννέα χοιρίδια που εκτράφηκαν χωρίστηκαν σε τέσσερις (4) ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα των ζώων 35 ημερών, όπου τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε δύο επιπλέον ομάδες εκ των οποίων η μία ήταν ομάδα ελέγχου ενώ στην άλλη χορηγήθηκε δίαιτα με πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείων. Η άλλη ομάδα ήταν αυτή των χοιριδίων 50 ημερών, η οποία χωρίστηκε επιμέρους αντίστοιχα σε ζώα ελέγχου και ζώα τα οποία εκτράφηκαν με πολυφαινολικό εκχύλισμα όπως στην ομάδα χοιριδίων 35 ημερών. Στην συνέχεια, έγινε ιστοληψία και μεταφορά των ιστών (πνευμονικός, παγκρεατικός και σπλήνα) στο εργαστήριο για την διεξαγωγή του πειράματος.

Έτσι, ελέγχθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, όπως ο προσδιορισμός της Αναγωγής της Γλουταθειόνης (GR), η Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η S-Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST) και η Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν:

- Για την Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το μόνο που αξίζει να σημειωθεί είναι η μικρή αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στον σπλήνα, στην ομάδα χοιριδίων 35 ημερών που εκτράφηκαν με πολυφαινολικό εκχύλισμα.
- Για την Περοξειδάση της Γλουταθειόνης (GPx) παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κυρίως στην ομάδα χοιριδίων 35 ημερών, και στους τρεις ιστούς.
- Για την S-Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST) παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και στις δύο βασικές ομάδες (35 και 50 ημερών) και στους τρεις ιστούς.
- Για την Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα χοιρίδια ελέγχου τόσο στις 35 ημέρες, όσο και στις 50 ημέρες και στους τρεις ιστούς.

Συμπερασματικά, τα πολυφαινολικά πρόσθετα των Υ.Α.Ε είχαν ευεργετική επίδραση στους εξεταζόμενους ιστούς μέσω της αύξησης της δράσης της περοξειδάσης της γλουταθειόνης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα ήταν θετικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια χρήση των Υ.Α.Ε στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων θα επιλύσει ταυτόχρονα και οικολογικά προβλήματα που δημιουργούνται όταν αυτά εναποτίθενται αλόγιστα στο περιβάλλον.

Abstract

In the present study, a farming took place at the stage of ab lactation of nineteen (19) young pigs, the Landrace × Large White - Duroc - Pietrain race, with feed containing polyphenolic additives from treated Olive Mill Wastewaters (OMWW) in order to examine the effects on the redox status in tissues (lungs, pancreas and spleen) using oxidative stress markers.

The nineteen (19) sheep were divided into four (4) groups. The first group consisted of the 35-day-old animal group, where piglets were divided into two additional groups, one of which was a control group, while the other group was given a polyphenolic extract from OMWW. The other group was that of the 50-day-old piglet, which was divided respectively, in control animals and animals which were bred with polyphenolic extract. Subsequently, tissues were collected and transported (lung, pancreatic and spleen) to the laboratory for the analysis.

Thus, 4 oxidative stress markers have been tested, that is, as Glutathione Reduction (GR), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-Transferase (GST) and Peroxidase Dismutase (SOD).

Accoding to the results:

- No statistically significant differences were observed between the control and polyphenolic groups for glutathione reductase (GR). The only difference was the slight increase in enzyme activity in the spleen, in the group of 35-day-old piglets fed with polyphenolic extract.
- For Glutathione Peroxidase (GPx), an increase in enzyme activity was observed mainly in the 35 day old guinea pig group in all three tissues in the polyphenolic group compared to control.
- For glutathione S-transferase (GST), the enzyme activity was reduced in both polyphenolic groups (35 and 50 days) compared to control in all three tissues.
- No statistically significant differences were observed for the superoxide dismutase (SOD) between the control and polyphenolic groups.

In conclusion, OMWW polyphenolic additives exhibited beneficial effects on some tissues, especially through the increase in the activity of GPx enzyme. Therefore, these results were positive, especially when they are combined with the fact that OMWW use for the production of biofunctional foods will also solve environmental problems that arise when OMWW are discharged into the environment.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	1
1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	2
1.1.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	4
1.1.3. Δημιουργία ελευθέρων ριζών.....	5
1.2. Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	7
1.3. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	11
1.3.1. Γενικά.....	11
1.3.2. Στην υγεία των ζώων.....	12
1.4. Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	12
1.5. Πολυφαινόλες.....	13
1.5.1. Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών.....	13
1.5.2. Ιδιότητες πολυφαινολών.....	15
1.5.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	16
1.5.4. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών.....	16
1.5.5. Επιδράσεις πολυφαινολών από συστατικά ελαιολάδου και Υ.Α.Ε.....	17
1.5.5.1. Συστατικό Ελαιοπρωτεΐνη.....	17
1.6. Απόβλητα Ελαιοτριβείων.....	19
1.7. Σκοπός.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1. Γενικά.....	20
2.2. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος.....	21
2.3. Ζώα και Δίαιτες.....	23
2.4. Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση.....	24
2.4.1. Ιστοληψία και μεταφορά.....	24
2.4.2. Ομογενοποίηση.....	24
2.5. Συγκέντρωση της Ολικής Πρωτεΐνης στους ομογενοποιημένους ιστούς.....	24
2.6. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	25
2.6.1. Προσδιορισμός της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης (GR).....	25
2.6.2. GPx- Glutathione Peroxidase.....	29
2.6.3. Glutathione S-Transferase.....	32
2.6.4. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD).....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1. Προσδιορισμός της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης (GR).....	38
3.2. GPx- Glutathione Peroxidase.....	40
3.3. Glutathione S-Transferase.....	42
3.4. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD).....	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

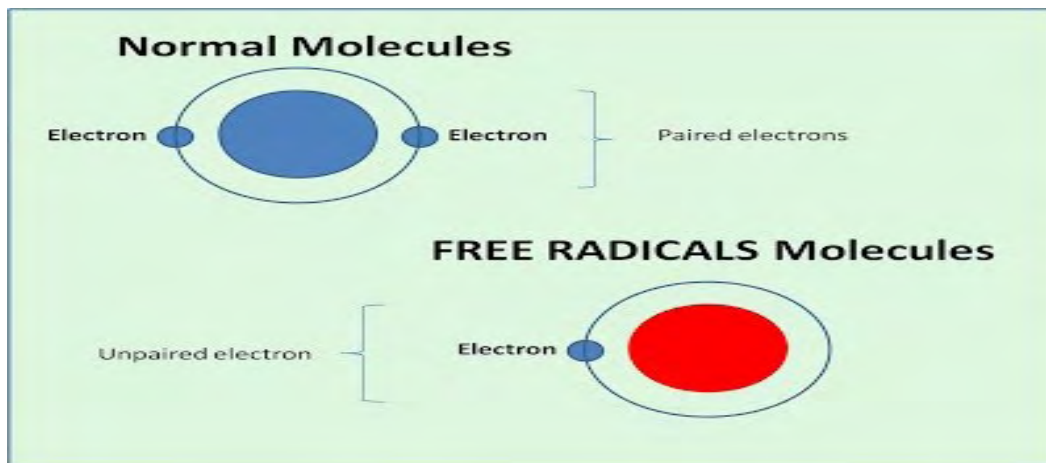
1.1. Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990).

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. 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 και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (*οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις*).

Είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπαστούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (*DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες*), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ενεργειακών συστημάτων να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (*ground state or atomic unexcited state*).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al. 2004; Pani et al. 2010; AICR 2007), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani et al. 2010) ή τον άνθρακα.



Εικόνα 1. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα.

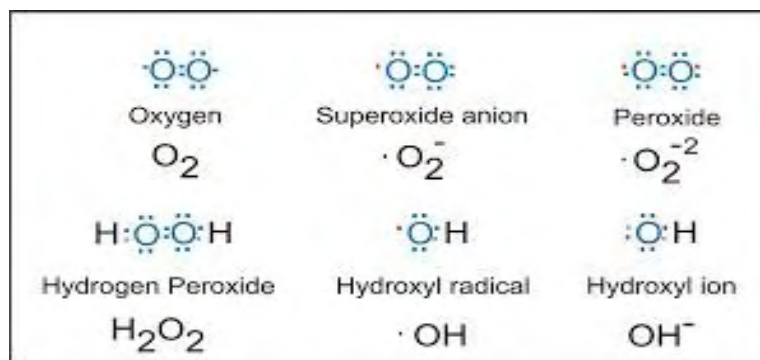
1.1.1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

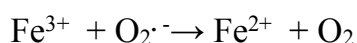
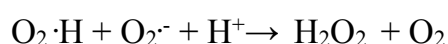
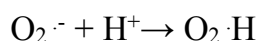
Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



Εικόνα 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

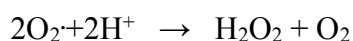
Ανιόν σουπεροξειδίου: Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου. Είναι ιδιαίτερα τοξικό και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τη οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης εισβαλόντων παθογόνων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από το σύμπλεγμα I και II. Παράγεται επίσης και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller et al. 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

Ρίζα υδροξυλίου: Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli 1995; Halliwell and Gutteridge 1999; Hayyanetal 2016). Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O_2^-) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell & Gutteridge 1990).

Υπεροξειδίο υδρογόνου: Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης, με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου :



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το OH·. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων. Επίσης, σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στον οργανισμό μοντέλο ψάρι ζέβρα που έδειξε ότι μετά από τραυματισμό του τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνονται, έγινε η υπόθεση ότι λειτουργεί σαν σήμα για την προσέλκυση λευκών αιμοσφαιρίων στο σημείο του τραύματος και την εκκίνηση της διαδικασίας επούλωσης (Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison 2009).

1.1.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO· και το διοξειδίο του αζώτου NO₂· καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO₂ και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO⁻) (Fang et al. 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές Μορφές Αζώτου.

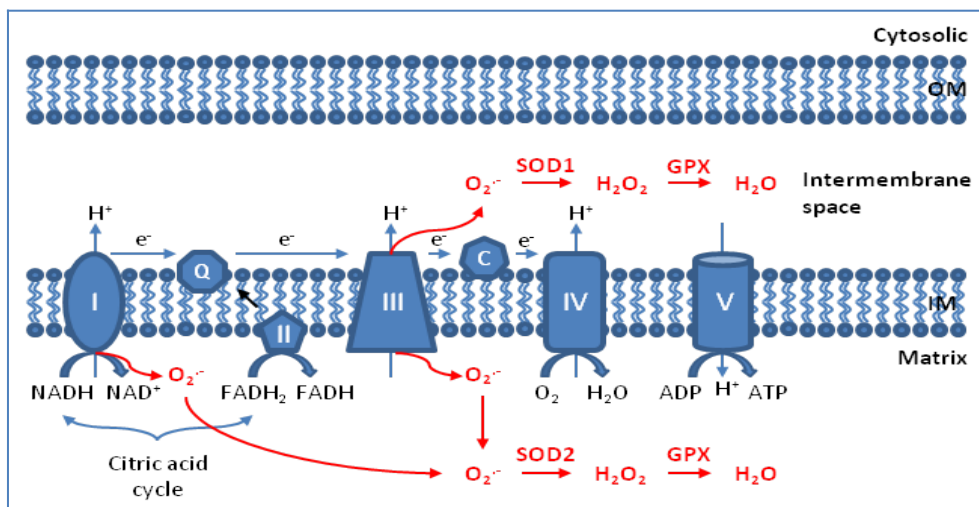
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO·)	Νιτρώδες Οξύ (HNO ₂)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO ₂ ·)	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO ⁺)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO ⁻)

1.1.3. Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς.

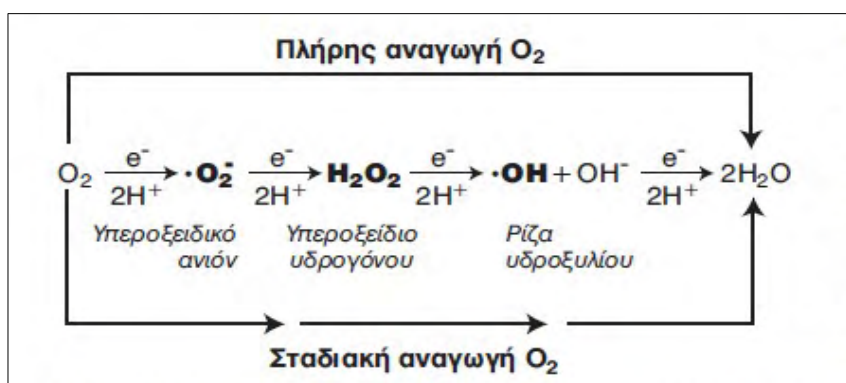
Οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελευθέρων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko et al. 2006):

A) Η πιο σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 3. Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

Β) Το υπόλοιπο οξυγόνου που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθοοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 και το OH^{\cdot} (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 4. Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαραγόντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

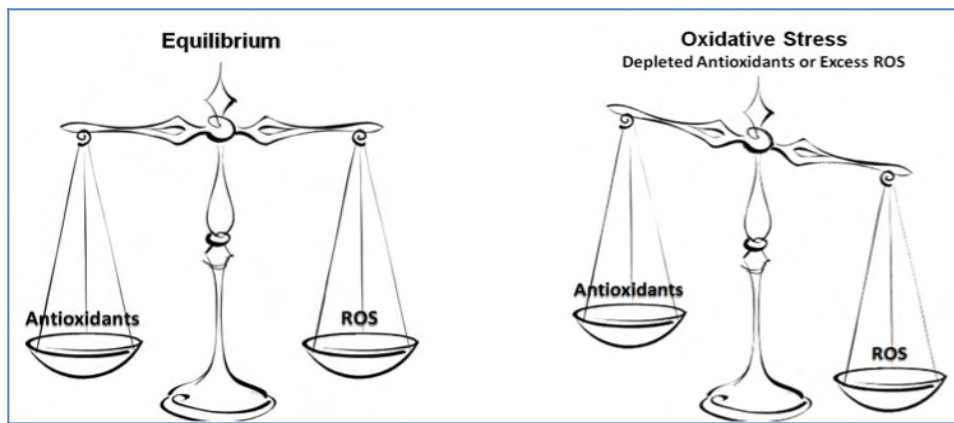
Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Μερικοί από τους εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (*μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός*), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (*ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης*) το οποίο προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (*ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450*). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξείδιο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.2. Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα.

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου.

Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 5. Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002). Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
2. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με την εξουδετέρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
3. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
4. Δρουν συνεργειακά, δηλαδή η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

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

Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (*SOD*), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης (*GST*), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (*GR*) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (*GPx*). Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα.

Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (*βιταμίνη E*, *β-καροτένιο*) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Gerogianno & Gourgoulialis 2006).

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (*τοκοφερόλες*), βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (*π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο*) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.

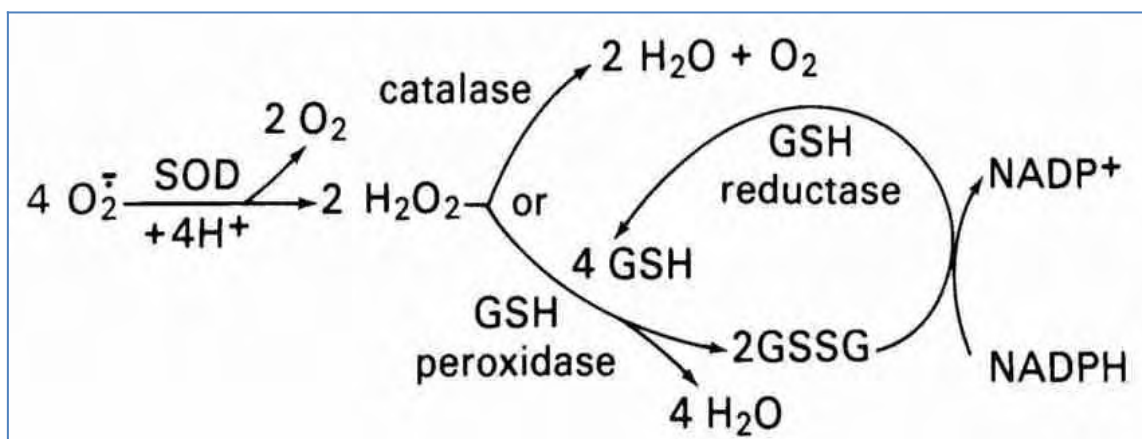
Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η αποσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Gerogianni & Gourgoulialis 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH, O²⁻ και NO.

Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljjsak 2011b).



Εικόνα 6. Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση (*SOD*) μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση (*catalase*) με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (*GSH peroxidase*) μειώνει την λιπιδική υπεροξειδωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δυο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης. Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (*GSSG*) στην ανηγμένη της μορφή της (*GSH*). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II το οποίο καταλύει τη σύζευξη της *GSH* με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι αντιδράσεις της Φάσης II καταλήγουν σε μεγάλη αύξηση της υδροφιλικότητας των ξενοβιοτικών και διευκολύνουν την απέκκρισή τους. Οι αντιδράσεις της Φάσης II περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις σύζευξης. Στις αντιδράσεις σύζευξης γίνεται προσθήκη γλυκουρονικών ομάδων,θειικών ομάδων, σύνδεση με γλουταθειόνη (*GSH*), σύνδεση με αμινοξέα ακετυλίωση και μεθυλίωση. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko et al. 2006).



Εικόνα 7. Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ή *ασκορβικό οξύ*) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργειακή δράση (Khallouki et al. 2003). Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστον αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (*HDL*).

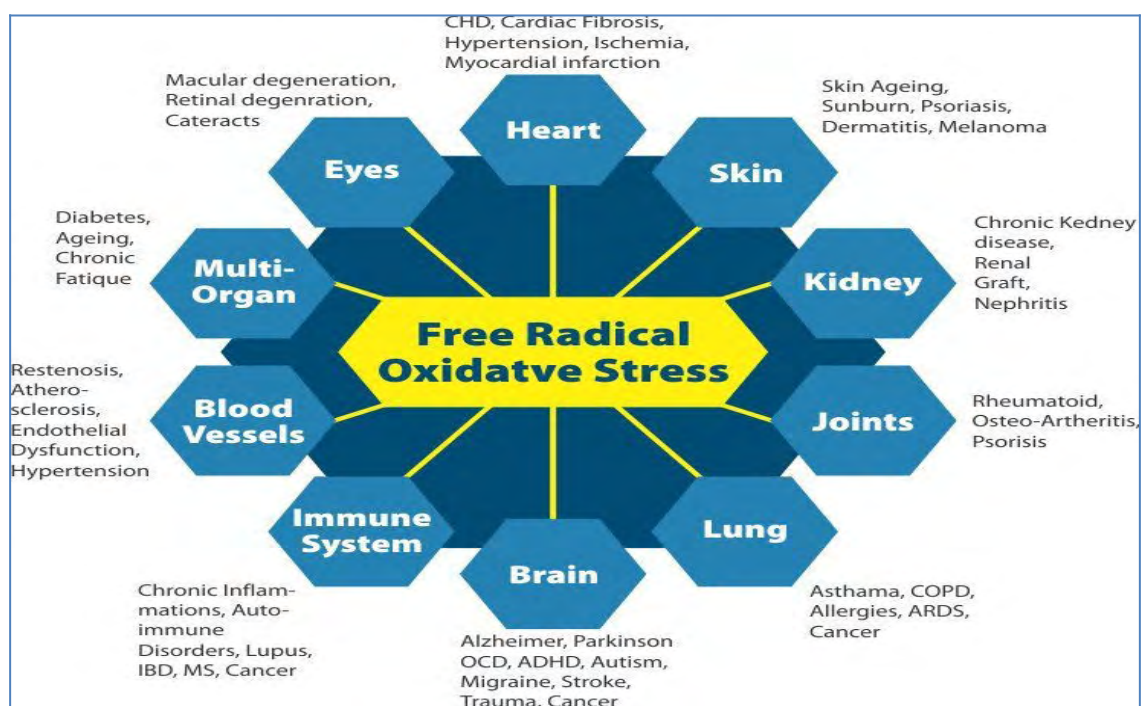
Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.3. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

1.3.1. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες- Γενικά

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

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



Εικόνα 8. Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

1.3.2. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες στην υγεία των ζώων

Αφού η παρούσα μελέτη διεξήχθη σε ζώα και πιο συγκεκριμένα σε χοιρίδια, είναι σημαντικό να αναφερθούμε ειδικά στις επιπτώσεις της υγεία των ζώων που προκαλούνται από τις διαταραχές του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ζώων, συμπεριλαμβανομένων των σωματικών (απογαλακτισμός, στέγαση, μεταφορά και νέος χειρισμός), αλλά και κοινωνικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν με τον χειρισμό τους και τις συνθήκες διαβίωσής τους. Έχει βρεθεί ότι οι παθολογικοί παράγοντες όπως η μολυσμένη από μούχλα τροφή, η λοίμωξη τύπου 2 από κυκλοφορικό μόσχευμα χοίρου και η κολίτιδα που προκαλείται από νατριούχοθειικό δεξτράνη παρουσιάζουν ανασταλτικό αποτέλεσμα στις δραστικότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων και προκαλούν οξειδωτικό στρες στους χοίρους. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι διαδικασίες γέννησης και απογαλακτισμού διαταράσσουν την οξειδωτική ισορροπία και προκαλούν οξειδωτική βλάβη στους χοίρους (Jie Yin et al. 2015).

Ακόμη, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt & Svenden 2007). Κάποιες πρόσφατες μελέτες (Jain & Flora 2012) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και έτσι στα νεαρά άτομα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες. Για παράδειγμα, ο απογαλακτισμός είναι μια αγχωτική περίοδος για τα γουρούνια, με αποτέλεσμα την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων (γαστρεντερικές διαταραχές) που σχετίζονται άμεσα με τους μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στο χοιρίδιο κατά την περίοδο εκείνη (Boudry, Peron, Le Huerou-Luron, Lalles & Seve 2004).

1.4 Ενεργητικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωοκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή.

Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Celi 2010).

1.5. Πολυφαινόλες

1.5.1 Γενικά - Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μια από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού, λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων καθώς και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006).

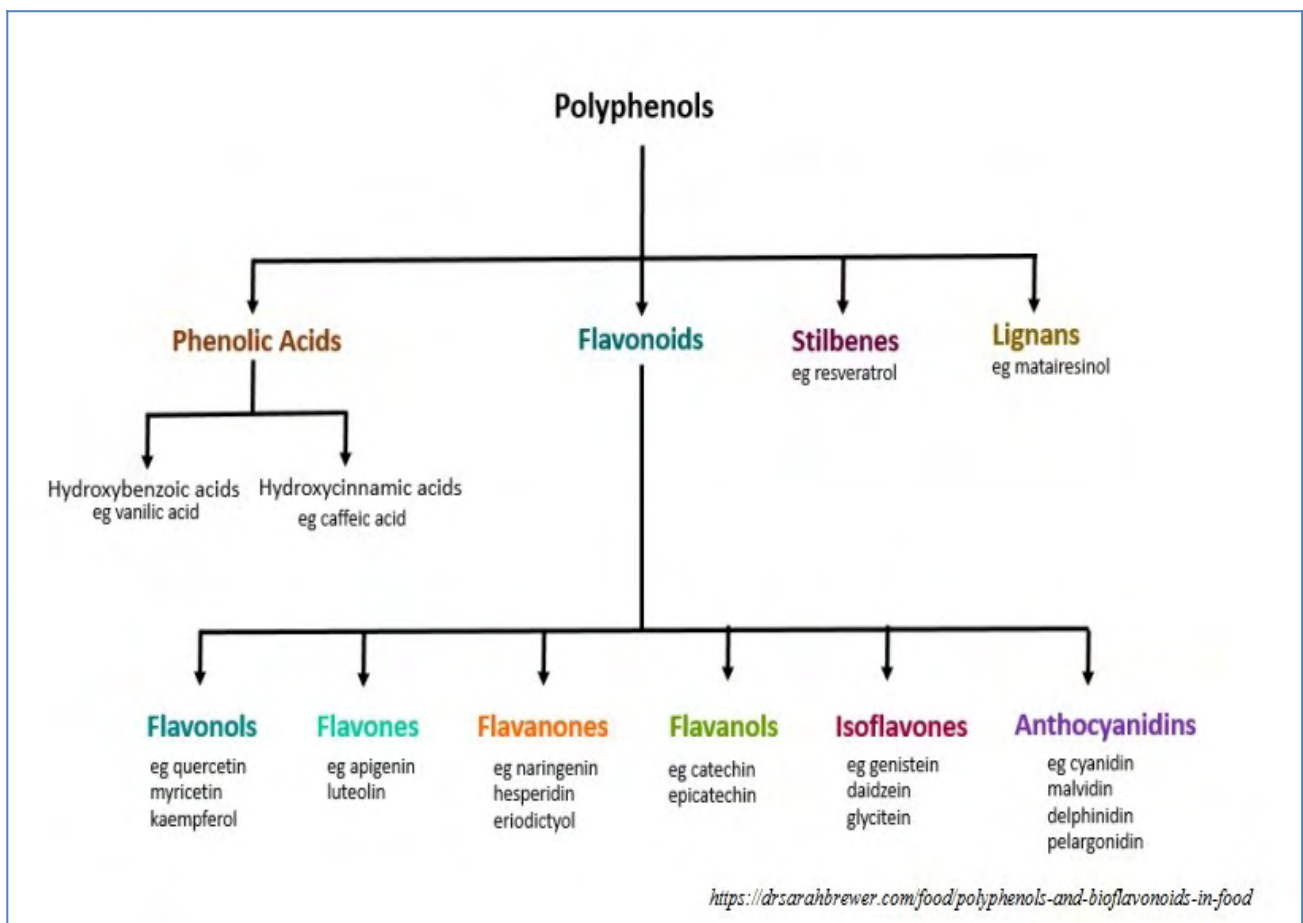
Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Συναντώνται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμα και ολιγοσακχαρίτης. Ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων είναι η γλυκόζη αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη.

Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια (Bravo L. et al. 1998). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

•**Φλαβονοειδή.** Αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και είναι ιδιαίτερα ευεργετικά για την υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, της δράσης τους στην καταπολέμηση των φλεγμονών αλλά και της αντικαρκινικής τους δράσης. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο λάχανο, το ελαιόλαδο και άλλα.

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες:

1. Φλαβονόλες
2. Φλαβανόλες
3. Φλαβόνες
4. Φλαβανόνες
5. Ισοφλαβόνες
6. Ανθοκυανιδίνες



Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών

•Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε 3 υποκατηγορίες:

◆**Φαινολικά οξέα:** Παρέχουν αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά ολικής άλεσης μας παρέχει επαρκείς ποσότητες από φαινολικά οξέα. Παραδείγματα τροφών που περιέχουν φαινολικά οξέα είναι τα μήλα, τα κεράσια, τα ακτινίδια, οι φράουλες, τα κρεμμύδια, το τσάι και άλλα.

◆**Λιγνάνες:** Οι λιγνάνες είναι χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά, και ιδιαίτερα στο λιναρόσπορο. Το λινάρι είναι ένα φυτό με εντυπωσιακά μωβ λουλούδια που είναι ενδημικά στη Μεσόγειο και την Ινδία. Οι λιγνάνες έχουν χρησιμοποιηθεί στα φυτικά φάρμακα για πολλούς αιώνες (*Naghma K. et al. 2007*).

◆**Σπιλβένια:** Με την πιο διάσημη από αυτά την Ρεσβερατρόλη, είναι ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, των καρδιαγγειακών νόσων και ιδιαίτερα της αθηρωμάτωσης, του καρκίνου και του σακχαρώδους διαβήτη. Βρίσκονται στα μούρα, στη φλούδα των σταφυλιών ιδιαίτερα των κόκκινων, στο κρασί και σε άλλες φυτικές τροφές.

1.5.2. Ιδιότητες πολυφαινόλων

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (*Dew et al. 2005*). Γενικά οι πολυφαινόλες:

➤ Θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων

➤ Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (*Scalbert A. et al., 2005*)

➤ Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινόλων, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (*Bode A.M., Dong Z., 2006*).

1.5.3. Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης των πολυφαινολών, που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Παράλληλα, οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν το ρόλο των πολυφαινολών στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert et al., 2005).

Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (*LDL*) στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι προάγγελος της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Είναι ακόμα γνωστός ο ρόλος του στον τραυματισμό κάποιου ιστού που εμφανίζεται μετά από επαναιμάτωση κατόπιν υποξίας.

Αυτό συμβαίνει επειδή η αποκατάσταση της ροής του οξυγόνου, παρ' όλη την αναγκαιότητά της για την επιβίωση του ιστού, οδηγεί στο σχηματισμό ROS. Ο καπνός του τσιγάρου, με τα διάφορα εποξειδία και υπεροξειδία που περιέχει, καθώς και η εισπνοή ανόργανων σωματιδίων όπως η άσβεστος προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων. Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, όπως καρκίνου, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας, διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου Χ χρωμοσώματος. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κρύβεται πίσω από το σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως (B.N. Ames et al., 1993, Cooke et al., 2003).

1.5.4. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών

Πολλές έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών η οποία συμβαίνει ,μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης, μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, πολυφαινόλες δρουν:

➤ ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξείδωσης 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 οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές OH^{\bullet} .

➤ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη.

Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Mennenetal 2005; Tsao 2010).

1.5.5. Επιδράσεις πολυφαινολών από Συστατικά ελαιόλαδού και 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.

1.5.5.1. Συστατικό Ελαιοευρωπεΐνη

Η ελαιοευρωπεΐνη είναι ένας γλυκοζίτης και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε. Η ελαιοευρωπεΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Guiso & Marra 2005).

Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως και διάφορα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της "συγκόλλησης" των αιμοπεταλίων. Η ελαιοευρωπεΐνη και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν προστατευτική δράση, κυρίως αντιοξειδωτική.

Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου. Οι ενώσεις αυτές, με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη 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 (F Visioli, Bellomo & Galli 1998).

Αυτή η αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση, όπως και άλλες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία είναι εξαιρετικά ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου.

Άλλα συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βανιλικό, συριγγικό και κουμαρικό.

Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες.

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

1.6. Απόβλητα Ελαιοτριβείων

Γενικά, τα απόβλητα των ελαιοτριβείων διακρίνονται σε υγρά και στερεά απόβλητα τα οποία ανάλογα με τον τύπο του ελαιοτριβείου διαφέρουν σε όγκο και σύσταση, ανάλογα με το σύστημα επεξεργασίας που χρησιμοποιούν. Έτσι, στα διφασικά φυγοκεντρικά συστήματα τα απόβλητα που προκύπτουν είναι υγρός ελαιοπυρήνας ενώ στα παραδοσιακά συστήματα πίεσης και στα τριφασικά φυγοκεντρικά συστήματα τα απόβλητα είναι και στερεά και υγρά (κατσίγαρος και ελαιοπυρήνας).

Το σημαντικότερο πρόβλημα σε ότι αφορά την διάθεση των αποβλήτων, είναι το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο τους το οποίο δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ από την άλλη, οι υψηλές συγκεντρώσεις οξέων και πολυφαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση φυτοτοξικών φαινομένων, προσδίδουν ανεπιθύμητες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες και υποβαθμίζουν το φυσικό περιβάλλον.

Αξίζει να σημειωθεί ότι για κάθε κιλό λαδιού παράγονται κατά μέσο όρο 5 κιλά υγρών αποβλήτων μεγάλου οργανικού φορτίου, ποσότητες εξαιρετικά μεγάλες αν αναλογιστούμε το γεγονός ότι η παραγωγή ελαιολάδου είναι εποχιακή και εντοπίζεται κυρίως από το μήνα Νοέμβρη έως Μάρτη.

Όπως έχουμε αναφέρει οι τρεις διαφορετικές επεξεργασίες παραλαβής ελαιολάδου (παραδοσιακή, διφασική, τριφασική) διαφέρουν σημαντικά στον όγκο και τη σύσταση των αποβλήτων που παράγουν. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται ορισμένα στοιχεία από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων σε σχέση με τον τύπο τους:

Πίνακας 3. Σύγκριση ορισμένων χαρακτηριστικών των αποβλήτων από τις διάφορες επεξεργασίες παραγωγής ελαιολάδου

<u>Χαρακτηριστικά αποβλήτων</u>	<u>Παραδοσιακή</u>	<u>Τριών φάσεων</u>	<u>Δύο φάσεων</u>
Στερεό υπόλειμμα (kg / tn καρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα (lt / tn καρπού)	600	1200	250
Φυτικό νερό των υγρών αποβλήτων (%)	94	90	99
BOD ₅ υγρών αποβλήτων (gr / lt)	100	80	10
Πολυφαινόλες στα υγρά απόβλητα (mg / lt)	203	164	200
Δείκτης πικρότητας	1,4	0,5	-

Τα απόβλητα χαρακτηρίζονται από

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

1.7. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GST, GPx, GR και SOD) σε ιστούς (πνεύμονας, σπλήνας και πάγκρεας) νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, που τους χορηγήθηκε ζωοτροφή, η οποία περιείχε πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείων, έτσι ώστε με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, να διερευνηθεί η ύπαρξη ή όχι της αύξησης της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικά

Οι ιστοί των χοιριδίων (πνεύμονας, σπλήνας και πάγκρεας) που μελετήθηκαν για την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GST, GPx, GR και SOD), ελήφθησαν από το εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι παραπάνω ιστοί, μελετήθηκαν επίσης για την αντιοξειδωτική κατάστασή τους, την μικροβιακή δραστηριότητα και την ποιότητα του κρέατος, σε μελέτη του εργαστηρίου Φυσιολογίας (Kafantaris I. et al., 2017).

Πριν παρουσιαστούν οι μέθοδοι ελέγχου της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αναφέρονται περιληπτικά, όλα τα στάδια που προηγήθηκαν και αφορούν την προετοιμασία των ζωοτροφών και τον χειρισμό των ζώων.

2.2. Περιγραφή Σκόνης Πολυφαινολικού Εκχυλίσματος

Το προϊόν με την εμπορική επωνυμία **MEDOLIVA®**, παράγεται σύμφωνα με μία κατοχυρωμένη διαδικασία, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη καθαρά φυτικά νερά που προέρχονται από τους διαχωριστήρες προσεκτικά επιλεγμένων ελαιουργείων που παράγουν μόνο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο αποκλειστικά από βιολογικές καλλιέργειες ελιάς στην Ελλάδα.



Εικόνα 10. Προϊόντα πολυφαινολικού εκχυλίσματος.

Η κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας διαδικασία παραγωγής δεν χρησιμοποιεί καθόλου οργανικούς διαλύτες ή άλλα επικίνδυνα υλικά αλλά μόνον υπέρ καθαρό πόσιμο νερό και εφαρμόζει μία φιλική προς το περιβάλλον λειτουργία, έχοντας υιοθετήσει την οδηγία της ΕΕ που αφορά στην Αρχή της Ολικής Αξιοποίησης (Principle of Total Discharge).

Το προϊόν παράγεται σε υγρή μορφή η οποία είναι σταθερή και ασφαλής χωρίς ανάγκη οποιασδήποτε προσθήκης συντηρητικού. Η μετατροπή του σε μορφή σκόνης, γίνεται με χρήση αντικρηκτικής τεχνολογίας συσκευής ξήρανσης με ψεκασμό (**SprayDryer**).

Περιγραφή προϊόντος

Υγρό φυσικό αντιοξειδωτικό, που παράγεται από την υδατώδη φάση του ελαιοκάρπου, με υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη οι οποίες είναι γνωστές ως τα πιο αποτελεσματικά φυσικά αντιοξειδωτικά με πλήθος επιστημονικών αναφορών για την συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία που οφείλεται στη δράση τους ως επιβραδυντές ελεύθερων ριζών. Το προϊόν περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες καφεϊκού και κουμαρικού οξέος, κατεχίνες και ανθοκυάνες. Η περιεκτικότητα το προϊόντος MEDOLIVA® σε υδροξυτυροσόλη / τυροσόλη είναι 30 φορές περισσότερο από ότι στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Χρώμα: σκούρο μαύρο

Ιξώδες: Χαμηλό

Συνολικά στερεά: 10% w / w ελάχιστο ή 24 BRIX

Οσμή: Χαρακτηριστική του ελαιοκάρπου

Γεύση: Πικρή φυσικό χαρακτηριστικό της πολυφαινολικής του σύνθεσης

pH: $4,5 \pm 0,1$

Χημική σύσταση

Το προϊόν έχει αναλυθεί με HPLC και περιέχει τις ακόλουθες πολυφαινόλες:

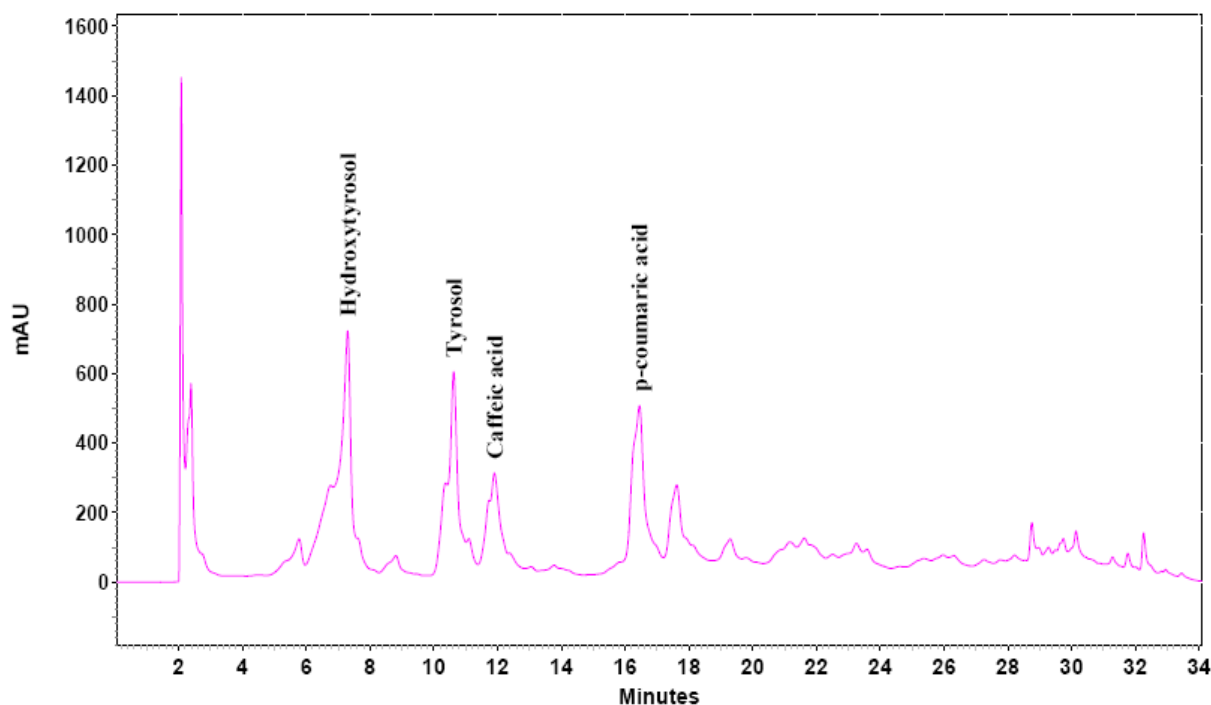
A) Υδροξυτυροσόλη

B) Τυροσόλη

Γ) Καφεϊκό οξύ

Δ) p-κουμαρικό οξύ

Ε) Ανθοκυάνες και κατεχίνες



Εικόνα 11. Χρωματογραφία (HPLC) του Πολυφαινολικού Προφίλ του Προϊόντος.

2.3. Ζώα και Δίαιτες

Το πείραμα εξετάστηκε και εγκρίθηκε από την αρμόδια κρατική αρχή. Συνολικά, 19 χοιρίδια της φυλής Landrace × Large White - Duroc - Pietrain, επιλέχθηκαν από το χοιροστάσιο του ΤΕΙ Θεσσαλίας (Λάρισα, Ελλάδα).

Τα χοιρίδια στεγάστηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (κύκλος 12 ωρών φωτός / σκότους, θερμοκρασία 27°C έως 33°C, υγρασία 50% έως 70%) σε τυποποιημένους απλούς κλωβούς (για κάθε ομάδα). Όλοι οι νεογέννητοι χοίροι τρέφονταν αποκλειστικά με μητρικό γάλα για 20 ημέρες. Στη συνέχεια, τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (12 χοιρίδια / ομάδα) ως εξής:

- (i) Ομάδα ελέγχου τροφοδοτούμενη με βασική διαίτα και
- (ii) Ομάδα χοιριδίων που χορηγήθηκε με διαίτα που περιέχει πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείων.



Εικόνα 12. Νεαρά χοιρίδια και χοιρομητέρα.

Από τις 20 ημέρες μετά τη γέννηση, τα χοιρίδια διαχωρίστηκαν από τις χοιρομητέρες τους για 8 -10 ώρες / ημέρα. Ωστόσο, μέχρι 35 ημέρες μετά τη γέννηση (δηλ. διατροφή με διαίτα για 15 ημέρες), τα χοιρίδια των δύο ομάδων τράφηκαν τόσο με μητρικό γάλα, όσο και με την αντίστοιχη διαίτα. Μετά από 35 ημέρες μετά τη γέννηση, στα χοιρίδια εφαρμόστηκε ο πλήρης απογαλακτισμός και τρέφονταν μόνο με την διαίτα για 15 μέρες. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής δοκιμής, τα χοιρίδια ζυγίστηκαν κάθε εβδομάδα και η λήψη τροφών καταγράφηκε επίσης, σε καθημερινή βάση.

	Groups ¹	
	Control	GP
BW (kg)		
Day 20 BW (kg)	4.80 ± 0.32	4.75 ± 0.21
Day 35 BW (kg)	7.71 ± 0.29	8.31 ± 0.12
Day 50 BW (kg)	10.40 ± 0.14	11.67 ± 0.11*

Πίνακας 4. Βάρη χοιριδίων.

Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± SEM. * Στατιστικά σημαντικές διαφορές, από τις τιμές της ομάδας ελέγχου (P <0,05).

Control: πρότυπη διαίτα, GP: διαίτα συμπληρωμένη με GP. Χοιρίδια / ομάδα = 12.

2.4. Ιστοληψία, μεταφορά στο εργαστήριο και ομογενοποίηση

2.4.1 Ιστοληψία και μεταφορά στο εργαστήριο

Στις 35 και στις 50 ημέρες μετά την γέννηση τους, τα νεαρά χοιρίδια οδηγήθηκαν στο σφαγείο της Γυρτώνης Λάρισας. Για τη συλλογή ιστών, τα χοιρίδια θυσιάστηκαν σε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα. Όλες οι σχετικές διαδικασίες (π.χ.: αναισθητοποίηση με CO₂, σφαγή, απομάκρυνση αίματος, διαχωρισμός των σπλάχνων και πλύση), εκτελέστηκαν με ειδικές μηχανές και εξειδικευμένο προσωπικό. Τα δείγματα των ιστών αφαιρέθηκαν χειρουργικά και τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασετίνες και ύστερα σε υγρό άζωτο. Έτσι, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -80°C.

2.4.2. Ομογενοποίηση Ιστών

Αρχικά, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν (1 μέρος ιστού σε 5 μέρη PBS), σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCl και 1mM EDTA καθώς και ένα μείγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Diagnostics GmdH). Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωσή της μεγαλύτερης δυνατής πορότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε (15000 gr – 5 min – 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε eppendorf στους -80°C.

2.5. Συγκέντρωση της Ολικής Πρωτεΐνης στους Ομογενοποιημένους Ιστούς

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης.

Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm.

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης αλβουμίνης των δειγμάτων, κάθε φορά προστίθενται 20μL από το ομογενοποιημένο δείγμα σε 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. (Τα δείγματα είναι αραιωμένα με PBS 1:20).

Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Για κάθε δείγμα γίνονται 3 επαναλήψεις για μείωση των σφαλμάτων. Έπειτα, ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595nm. Ως τυφλό, χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20μL H₂O και 1ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τέλος, παρασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη της αλβουμίνης.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, όπου ο άξονας $y=Abs$ στα 595nm και ο $x=Συγκέντρωση$ (μg/ml).

Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

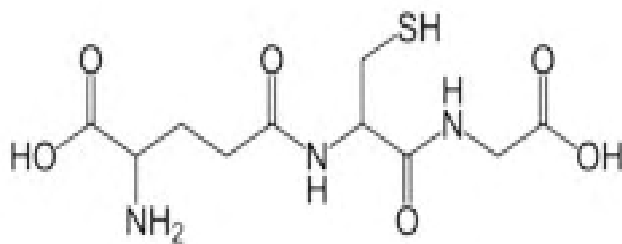
2.6. Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στους Ιστούς

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα γίνονταν 3 επαναλήψεις του κάθε δείγματος για καλύτερη αξιοπιστία και για μείωση των πειραματικών σφαλμάτων.

2.6.1 Προσδιορισμός της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR)

ΓΕΝΙΚΑ

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεΐνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην 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 (Pastoreet al. 2003).

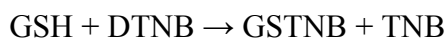


Εικόνα 13. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) είναι γνωστή και ως δισουλφίδιο της αναγωγής της γλουταθειόνης και είναι ένα κρίσιμο ένζυμο έναντι του οξειδωτικού στρες, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση του αναγωγικού υποκυτταρικού περιβάλλοντος. Λειτουργεί ως διμερές δισουλφίδιο οξειδοαναγωγής και χρησιμοποιεί το FAD ως προσθετική ομάδα και το NADPH για να ανάγει ένα μόριο GSSG σε δύο μόρια GSH. Η GSH έχει αντιοξειδωτικό ρόλο εξουδετερώνοντας τις ρίζες του OH, O₂ και πολλών ηλεκτρονιόφιλων. Επιπρόσθετα, παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών και δρα σαν συμπάρονο σε βασικά ένζυμα αποτοξίνωσης, συμμετέχει στη μεταφορά και στην αναγέννηση βασικών αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνες E και C στις δραστικές τους μορφές. Ο λόγος GSH/ GSSG είναι ένας βασικός παράγοντας για να διατηρείται η οξειδωτική ισορροπία ενδοκυτταρικά, που αυτό είναι βασικό ώστε το κύτταρο να διατηρεί υψηλά επίπεδα GSH και χαμηλά επίπεδα GSSG. Αυτή η λεπτή ισορροπία διατηρείται κυρίως από το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η παρούσα μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας της GR βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η GR καταλύει την γενική αντίδραση μετατροπής της GSSG σε GSH. Όταν η GSH αντιδρά με το DTNB σχηματίζεται το TNB, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση στα 412nm. Η ενζυμική δραστηριότητα της GR αξιολογείται από την παρακολούθηση της αλλαγής της απορρόφησης στα 412nm για 1min.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Phosphate buffer 200Mm, 1mM EDTA (pH 7,5)

K_2HPO_4 (Monopotassium phosphate or potassium phosphate monobasic) MW: 136 g/mol

K_2HPO_4 (Dipotassium hydrogenphosphate or potassium phosphate dibasic) MW:174 g/mol

EDTA anhydrous (Ethylene diamine tetraacetic acid, $C_{10}H_{16}N_2O_8$) MW: 292,24 g/mol ή EDTA disodium dehydrate salt ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) MW: 372,24 g/mol

Για την παρασκευή 500ml Phosphate buffer φτιάχνουμε 250ml KH_2PO_4 και 250ml K_2HPO_4
Ζυγίζουμε 13,6g KH_2PO_4 και τα διαλύουμε σε 250ml νερό.

Για το K_2HPO_4 ζυγίζουμε 17,4g και τα διαλύουμε σε 250ml νερό.

Σε ένα ζεστό ποτήρι ανακατεύουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε 146 mg άνυδρο δινάτριο EDTA ή 186 mg ενυδατωμένο δινάτριο EDTA. Αν απαιτείται, διορθώνουμε με NaOH ή HCL 1N μέχρι Ph 7,8.

DTNB [5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] [$SC_6H_3(NO_2)CO_2H$]₂ MW:396,35 g/mol, 3Mm σε 10 mM phosphate buffer

Για να παρασκευάσουμε 10ml από το 3mM DTNB διαλύουμε 11,9 mg από το DNTB σε 10ml από 200 mM phosphate buffer. Το DTNB είναι πολύ ευαίσθητο διάλυμα. Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

B-NADPH (β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate, $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3 \cdot 2H_2O$) MW:833,35 g/mol, 2mM

Για να παρασκευάσουμε 1ml από το 2Mm β-NADPH διαλύουμε 1,49 mg σε 1ml από το 200 mM του phosphate buffer.

Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

GSSG ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$) MW:612,6 g/mol, 20 mM

Για την παρασκευή 1ml από το 20Mm GSSG διαλύουμε 50 mg από το GSSG σε 200Mm phosphate buffer. Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Glutathione Reductase (GR)

Έχουμε 500 U/280 μl από το stock διάλυμα. Για να φτιάξουμε 1 U/ml διαλύματος διαλύουμε 5μl (5μl ισούνται με 31,9 U/ml) από το stock διάλυμα σε 154,4 μl αποσταγμένου νερού. Η δραστηκότητα της GR στην κυψελίδα είναι 0,026 U/ml.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Πραγματοποιούμε εκ νέου αραιώση του ιστού 1:5 με 70 μl ιστού και 280 μl PBS, αναδεύουμε και φυλάσσουμε σε erpendorf. Έτσι, η συνολική αραιώση του ιστού είναι 1:9.

Γεμίζουμε σωληνάκια erpendorfs με τα ακόλουθα αντιδραστήρια με συγκεκριμένη σειρά και αναμιγνύουμε τα περιεχόμενα.

Πίνακας 5. Προετοιμασία δειγμάτων

	standard	sample
Phosphate buffer	700μl	700μl
DNTB	250μl	250μl
B-NADPH	50μl	50μl

Για τα standard, μεταφέρουμε το περιεχόμενο από τα erpendorfs σε κυψελίδα, και προσθέτουμε 50μl από GSSG, τοποθετούμε την κυψελίδα στο φασματόμετρο και αμέσως μετά, προσθέτονται 25μl από GR και καταγράφεται η απορρόφηση στα **412nm για 1min**.

Για τα δείγματα, μεταφέρονται τα περιεχόμενα των erpendorfs σε πλαστική κυψελίδα, προσθέτουμε 50μl από GSSG, και γρήγορα προσθέτουμε και 25μl από το δείγμα μας διαλυμένο, ανακινούμε την κυψελίδα τρεις φορές (χρησιμοποιώντας παραφίλμ) και καταγράφεται η απορρόφηση στα 412nm για 1min.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

GR activity (U/g protein) = $S \times 0,026 / St \times 38 \times A \times B / \text{Protein conc. (mg/ml)}$.

S= slope sample. St= slope GR standard.

Slope= αλλαγή απορρόφησης σε 1min.

Το 38 είναι ο παράγοντας διάλυσης των δειγμάτων στην κυψελίδα (950 μl/25μl δείγματος), A είναι η αραιώση κατά την διάρκεια του πειράματος στο δείγμα, το B είναι η αραιώση στο δείγμα κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και 0,026 U/ml είναι η τελική δραστικότητα της GR από τα στάνταρ στη κυψελίδα.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του ιστού προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε mg/ml χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Bradford.

2.6.2. GPx – Glutathione peroxidase

ΓΕΝΙΚΑ

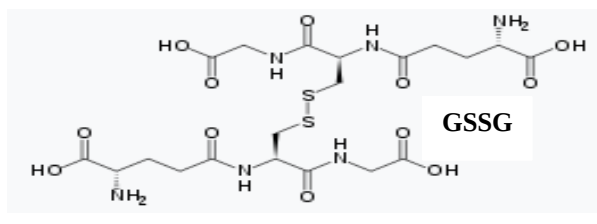
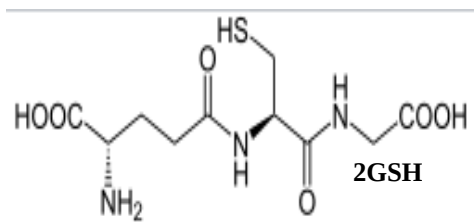
Οι υπεροξειδάσες της Γλουταθειόνης είναι τετραμερή ένζυμα μίας υπεροικογένειας με σελενοκυστεΐνη (C₃H₇NO₂Se) στην ενεργή περιοχή. Η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) είναι λοιπόν μια επιλεκτική σεληνοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από τέσσερις υπομονάδες, που η κάθε μία περιέχει ένα άτομο σεληνίου ενσωματωμένο σε ένα μόριο σεληνοκυστεΐνης, όπου το θείο της ομάδαςθειόλης της κυστεΐνης, αντικαθίσταται από σελήνιο.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης υπάρχει στα εξωκυτταρικά υγρά και στα κύτταρα του κυττοσολίου και των μιτοχονδρίων. Η βιοχημική λειτουργία της GPx, είναι η μείωση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους και η μείωση του ελεύθερου υπεροξειδίου του υδρογόνου στο νερό.

Αρκετά ισοένζυμα κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα οποία ποικίλουν σε κυτταρική θέση και εξειδίκευση υποστρώματος. Η (GPx1) είναι η πιο άφθονη εκδοχή, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν όλων των ιστών των θηλαστικών, για το οποίο προτιμώμενο υπόστρωμα είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η (GPx4) έχει υψηλή προτίμηση στα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια. εκφράζεται σε σχεδόν κάθε κύτταρο θηλαστικού, αν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Η (GPx2) είναι εντερικό και εξωκυτταρικό ένζυμο, ενώ η (GPx3) είναι εξωκυτταρική, ιδιαίτερα άφθονη στο πλάσμα (Muller FL et al. 2007). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οκτώ διαφορετικές ισομορφές (GPx1-8) στους ανθρώπους. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδωση και ανάγει το H₂O₂ σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δύο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης.

Η κύρια αντίδραση που η GPx καταλύει είναι:

$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ όπου το GSH αντιπροσωπεύει ανηγμένη μονομερική γλουταθειόνη και το GS-SG αντιπροσωπεύει το δισουλφίδιο γλουταθειόνης (οξειδωμένη). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την οξείδωση του άλατος ενός υπολείμματος σελενοκυστεΐνης με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτή η διαδικασία δίδει στο παράγωγο με μια ομάδα σεληνικού οξέος (RSeOH). Το σεληνικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε σελενόλη με διεργασία δύο σταδίων που αρχίζει με τη GSH για να σχηματίσει το GS-SeR και νερό. Ένα δεύτερο μόριο της GSH μειώνει το ενδιάμεσο GS-SeR πίσω στη σελενόλη, απελευθερώνοντας το GS-SG ως παραπροϊόν.



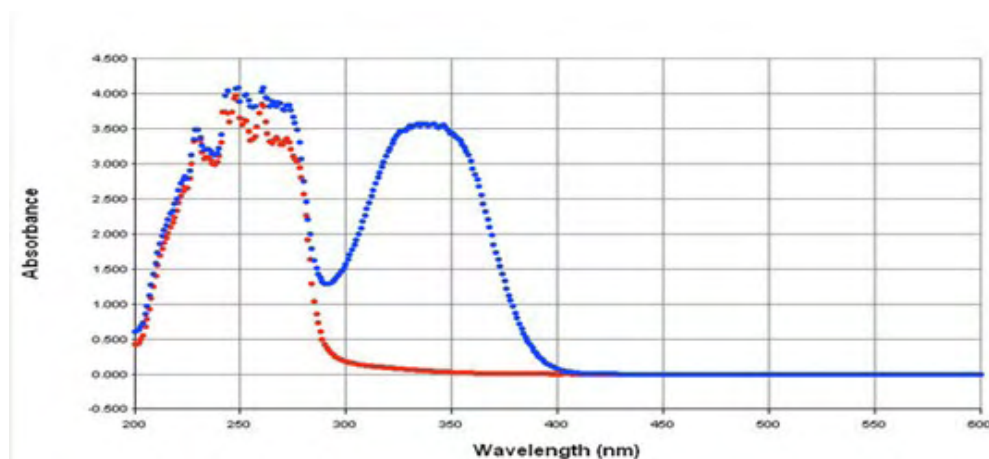
Εικόνες 14 & 15. Συντακτικοί τύποι της GSH και της GSS αντίστοιχα.

Το κατάλοιπο της σελενοκυστεΐνης συμμετέχει άμεσα στην δωρεά ηλεκτρονίου στο υπόστρωμα υπεροξειδίου και έτσι οξειδώνεται στην διαδικασία. Το ένζυμο τότε χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως δωρητής υδρογόνου για να αναγεννήσει την σελενοκυστεΐνη, με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH σε GS-SG.

Όσον αφορά την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την καταλάση, μία προφανής ερώτηση που δημιουργείται και αφορά τη συνέργεια ή τον ανταγωνισμό μιας και τα δύο ένζυμα απομακρύνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στα ερυθροκύτταρα λείπουν τα υποκυτταρικά οργανίδια και τα δύο ένζυμα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Όταν το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται σε χαμηλά ή μέσα επίπεδα από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης και την δράση της SOD, τότε η GPx είναι το ένζυμο που το εξουδετερώνει. Σε αντίθεση, όταν τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι υψηλά, η καταλάση είναι το ένζυμο που το εξουδετερώνει.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου της GPx βασίζεται στην οξείδωση της NADPH. Πιο συγκεκριμένα, η GSSG παράγεται κατά την αναγωγή από ένα οργανικό υδροϋπεροξείδιο από την GPx και μειώνεται άμεσα και συνεχώς από μια περίσσεια δραστικότητας αναγωγάσης γλουταθειόνης παρέχοντας ένα σταθερό επίπεδο της GSH. Η συνακόλουθη οξείδωση του NADPH σε NADP⁺, παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.



Εικόνα 16. Καμπύλη απορρόφησης των μορίων NADPH και NADP⁺

NADPH → μπλε κουκκίδες and

NADP⁺ → Κόκκινες κουκκίδες

(Paul Held et al. 2007)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Phosphate buffer 100 mM (pH 7)

MW (KH₂PO₄): 136 g/mol

MW (K₂HPO₄): 174 g/mol

Για να φτιάξουμε 500 ml από το phosphate buffer, χρησιμοποιούμε 250 ml KH₂PO₄ και 250 ml K₂HPO₄.

Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 6,8 gr. και το διαλύουμε σε 250 ml dH₂O.

Για το K₂HPO₄ ζυγίζουμε 8,7 gr. και το διαλύουμε σε 250 ml dH₂O.

Σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε 186 mg EDTA συγκέντρωσης 1mM. Ελέγχουμε το pH να είναι 7.

GSH (C₁₀H₁₇N₃O₆S) MW: 307,3 g/mol

Κατά την ημέρα του πειράματος παρασκευάζουμε διάλυμα το οποίο περιέχει 31 mg GSH σε 10 ml dH₂O.

NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, C₂₁H₂₉O₁₇P₃) MW: 744,41 g/mol

Κατά την ημέρα του πειράματος παρασκευάζουμε διάλυμα 1,5 mM NADPH σε 0,1% NaHCO₃ σε 10 ml dH₂O, διαλύοντας 11,2 mg NADPH και 10 mg NaHCO₃ σε 10 ml dH₂O.

Glutathione Reductase

Για να παρασκευάσουμε διάλυμα 2,4 U/ml GR, αραιώνουμε 10μl από το εμπορικό stock (500 U, 5 mg/ml, 120 U/mg protein), σε 4990 phosphate buffer.

tert- Butyl hydroperoxide (t-BuOOH)

Για να παρασκευάσουμε 12 mM διάλυμα του t-BuOOH, αραιώνουμε 5 μl του t-BuOOH (συγκέντρωση 6M), σε 2495 μl H₂O

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Πραγματοποιούμε εκ νέου αραιώση του ιστού 1:5 με 70 μl ιστού και 280 μl PBS, αναδεύουμε και φυλάσσουμε σε eppendorf. Έτσι, η συνολική αραιώση του ιστού είναι 1:9.

Στην συνέχεια, προσθέτουμε σε eppendorfs των 1,5 ml τα παρακάτω:

.500 μl phosphate buffer

.100 μl Ομογενοποιημένου ιστού

.100 μl GR

.100 μl GSH

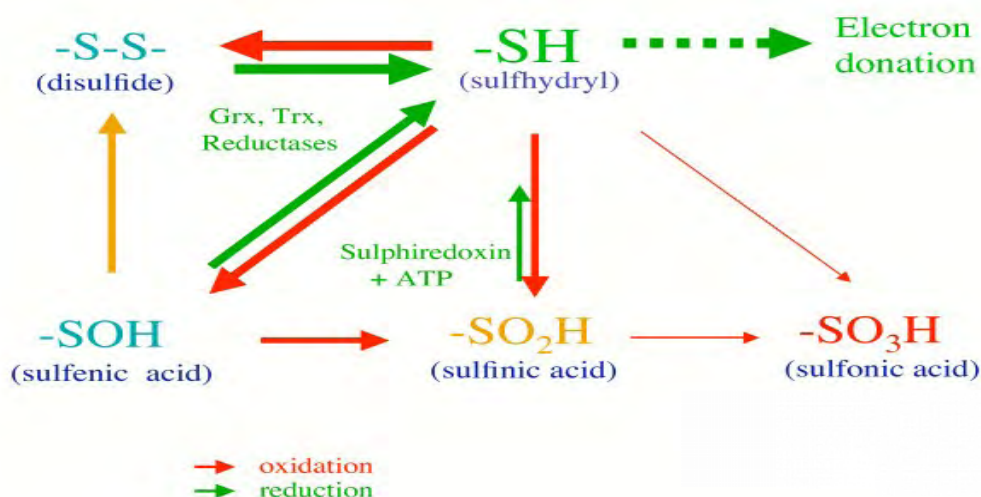
Ακολουθεί vortex και επώαση για 10 λεπτά της ώρας.

Κατόπιν, τοποθετούμε το μίγμα σε κυψελίδα και προσθέτουμε 100 μl του διαλύματος NADPH και επωάζουμε για 3 λεπτά της ώρας, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προσθέτουμε στην κυψελίδα 100 μl t- BuOOH, την ανακινούμε καλύπτοντας με παραφίλμ και παρατηρούμε την μείωση της απορρόφησης στα 340 nm για 5 λεπτά της ώρας. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα.

2.6.3. Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S – Transferase)

ΓΕΝΙΚΑ

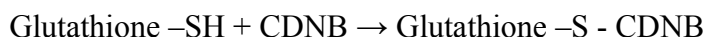
Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases, GSTs) είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που καταλύουν την πυρηνόφιλη δέσμευση της σουλφυδρυλικής ομάδας του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH: γ -Glu-Cys-Gly), στο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (άνθρακα, αζώτου, θείου) ενδογενών και ξενοβιοτικών ενώσεων (Chronopoulou *et al.*, 2012a, Hayes *et al.*, 2005), σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με τη GSH. Τα σύμπλοκα αυτά αποβάλλονται από το κύτταρο, μέσω των αντλιών εκροής MRP (Multidrug Resistance Protein) των μεμβρανών (Ishikawa, 1992). Αυτή η δραστηριότητα αποτοξινώνει ενδογενείς ενώσεις όπως υπεροξειδωμένα λιπίδια και καθιστά δυνατή την διάσπαση των ξενοβιοτικών. Η GST επίσης εμπλέκεται στη μείωση της βλάβης των ελευθέρων ριζών. Οι GSTs μπορούν να συνιστούν έως και 10% της κυτοσολικής πρωτεΐνης σε ορισμένα όργανα των θηλαστικών (Boyer TD 1989; Mukanganyama S. *et al.* 2011; Oakley A. 2011).



Εικόνα 17. Αντίδραση της ομάδας σουλφυδρυλίου σε απόκριση οξειδωτικού στρες και ενδομετατροπής μεταξύ των προϊόντων οξείδωσης. Τα κατάλοιπα σουλφυδρυλίου σχηματίζουν διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή και την έκταση του οξειδωτικού στρες.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ενζυμική δράση της GST βασίζεται στην εξής αντίδραση:



Η αντίδραση μετράται παρατηρώντας τη σύζευξη του 1-χλωρο, 2,4-δινιτροβενζολίου (*1-chloro, 2,4-dinitrobenzene:CDNB*) με ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Αυτό γίνεται παρακολουθώντας την αύξηση στην απορρόφηση στα 340nm. Μία μονάδα ενζύμου θα καταλύσει 10 nmol CDNB με GSH ανά λεπτό στους 25°C.

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

Phosphate buffer 0.1M pH 7.4

0.1M K₂HPO₄ : $m = c \cdot MB \cdot V = 0,1 \text{ mol/l} \cdot 174,18 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} = 1,74 \text{ g}$

0.1M KH₂PO₄ : $m = c \cdot MB \cdot V = 0,1 \text{ mol/l} \cdot 136,09 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} = 1,36 \text{ g}$

Για 100ml buffer 80,2ml K₂HPO₄ και 19,8ml KH₂PO₄

GSH 1mM (σε Phosphate_buffer) φωτοευαίσθητο.

$m = 0,001 \text{ mol/l} \cdot 307,33 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} = 0,03 \text{ g}$ σε 100 ml. ή 3 mg σε 10 ml Phosphate_buffer

CDNB 1 mM (σε 95% ethanol) φωτοευαίσθητο.

$M = 0,001 \text{ mol/l} \cdot 202,6 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} = 0,02 \text{ g}$ σε 100 ml ή 2 mg σε 10 ml ethanol

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στην μέθοδο αυτή δεν πραγματοποιείται αραιώση. Οι ιστοί έχουν μόνο την αρχική αραιώση από την διαδικασία της ομογενοποίησης, 1:4.

Φτιάχνουμε τα tubes και τα βάζουμε στον κλίβανο να ζεσταθούν για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών προσθέτω διαδοχικά σε κάθε tube:

920 μl phosphate buffer 0,1M , pH: 7.4 + 50μl GSH 1mM + 20μl CDNB 1mM

Έπειτα, ακολουθεί vortex και επώαση για 5 λεπτά στον κλίβανο. Ακολούθως, γίνεται ο μηδενισμός με το BLANK, το οποίο περιέχει μόνο 10μl phosphate buffer. και έπειτα, προστίθενται σε κάθε tube 10μl δείγματος στην κυβελίδα UV, ανακίνηση με parafilm και μέτρηση μεταβολής της απορρόφησης στα 340nm για 3 min.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Προσδιορισμός της ταχύτητας όπου η αντίδραση είναι γραμμική - αυτή είναι η $\Delta 340 / \text{λεπτό}$.

a) Αφαιρούμε το $\Delta 340 / \text{λεπτό}$ για την τυφλή αντίδραση από το $\Delta 340 / \text{λεπτό}$ για κάθε αντίδραση δείγματος.

b) Η μοριακή απόσβεση του CDNB είναι $0,0096 \mu\text{M}^{-1} / \text{cm}$. Δραστηκότητα GST (U/ml) = $[(\text{προσαρμοσμένο } \Delta 340 / \text{λεπτό}) / 0,0096 \mu\text{M}^{-1} / \text{cm}] \times (1,0 \text{ ml} / 0,1 \text{ ml}) \times \text{κάθε αραίωση δείγματος}$.

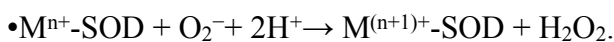
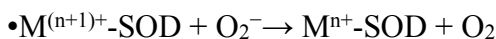
2.6.4. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

ΓΕΝΙΚΑ

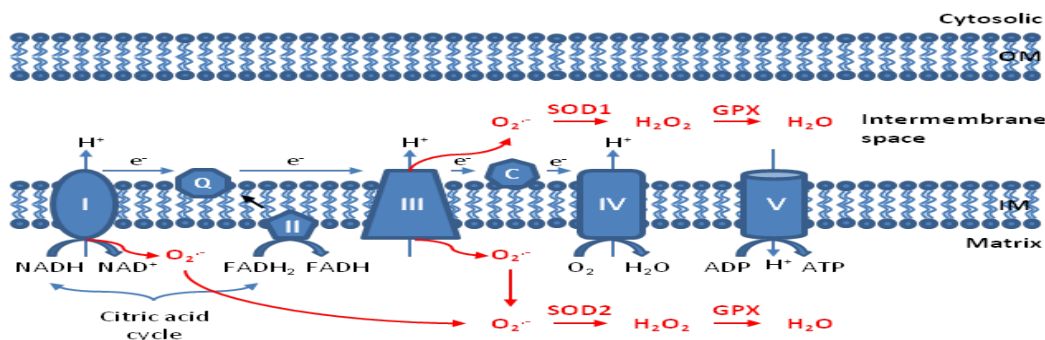
Είναι ένα ένζυμο που μετατρέπει τη ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^-) είτε στο συνηθισμένο μοριακό οξυγόνο (O_2) είτε στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το υπεροξείδιο παράγεται ως υποπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και εάν δεν ρυθμίζεται, προκαλεί πολλούς τύπους κυτταρικών βλαβών. (Hayyan M, et.al.2016). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι επίσης επιβλαβές και αποικοδομείται από άλλα ένζυμα όπως η καταλάση. Έτσι, η SOD είναι μια σημαντική αντιοξειδωτική άμυνα σε σχεδόν όλα τα ζωντανά κύτταρα που εκτίθενται στο οξυγόνο.

Η SOD μετατρέπει τη ρίζα του σουπεροξειδίου, είτε προσθέτοντας ή αφαιρώντας ένα ηλεκτρόνιο από το μόριό του, μετατρέποντας αυτό σε δύο λιγότερο επιβλαβή είδη: στο μοριακό οξυγόνο ή στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η κατάλυση της ρίζας του σουπεροξειδίου από το ένζυμο της δισμουτάσης παρουσιάζεται στις παρακάτω αντιδράσεις:

Η γενική μορφή, που ισχύει για όλες τις διαφορετικές μορφές της SOD, που έχουν συντονιστεί με μέταλλα μπορεί να γραφεί ως εξής:



όπου $\text{M} = \text{Cu}(n=1); \text{Mn}(n=2); \text{Fe}(n=2); \text{Ni}(n=2)$.



Εικόνα 18. Σύμπλοκο αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

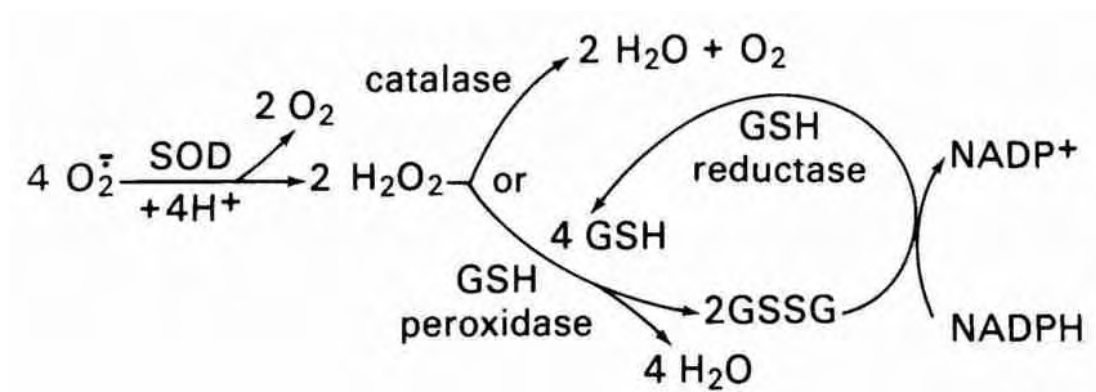
Διαρροή των ηλεκτρονίων στο συγκρότημα I και III (σύμπλοκο αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων), οδηγεί σε μερική αναγωγή του οξυγόνου για το σχηματισμό υπεροξειδίου. Στη συνέχεια, το O_2^- μετατρέπεται σε H_2O_2 από την (SOD2) στην μιτοχονδριακή μήτρα και από την (SOD1) στο μιτοχονδριακό χώρο της ενδομεμβράνης.

Υπολειτουργία ή έλλειψη του ενζύμου αυτού, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS που συμβάλλουν στην αθηρογένεση (Nojiri H, et.al., 2006).

Τρεις μορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης υπάρχουν στους ανθρώπους. Η SOD1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, η SOD2 στα μιτοχόνδρια και η SOD3 εξωκυτταρικά. Το πρώτο είναι ένα διμερές (αποτελείται από δύο μονάδες), ενώ τα άλλα είναι τετραμερή (τέσσερις υπομονάδες). Η SOD1 και SOD3 περιέχουν χαλκό και ψευδάργυρο, ενώ η SOD2, το μιτοχονδριακό ένζυμο, έχει μαγγάνιο στο κέντρο αντίδρασης του (Corpas FJ, et.al.2006).

Κυτταρική θέση	Κυτοσόλιο και μιτοχονδριακός ενδιάμεσος χώρος	Μιτοχονδριακή μήτρα	Εξωκυττάριος χώρος
Μέταλλο	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Cu, 1 Zn
Μοριακό βάρος,kDa	32.5	24.7	30
Υπομονάδα	Διμερές	Τετραμερές	Τετραμερές
Αναστολή από CN^-	Ναι	Όχι	Ναι
Αναστολή από H_2O_2	Ναι	Ναι	Ναι
Σταθερά ρυθμού αντίδρασης με O_2^-	0.62×10^9	1.2×10^9	0.72×10^9

Εικόνα 19. Ιδιότητες των ισοενζύμων της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).



Εικόνα 20. Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) βασίστηκε στη μέθοδο του άλατος τετραζολίου νιτροδών ελαίων (NBT) σύμφωνα με τους Oberley και Spitz [L. W. Oberley and D. R. Spitz, "Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue," Methods in Enzymology, vol. 105, pp. 457–464, 1984].

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Buffer Master mix (για 20 δείγματα):

13,8ml DETAPAC – buffer + 0,5ml NTB (2,24 mM) + 1,7 xanthine.

Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Phosphate buffer 0,05 M, pH 7,8:

Για 1lt buffer: 908 ml K_2HPO_4 + 92 ml KH_2PO_4

K_2HPO_4 : 8,7 g σε 1000 ml H_2O

KH_2PO_4 : 0,68 g σε 100 ml H_2O

DETAPAC – buffer (1,34 mM): 0,2653 g σε 500 ml Phosphate buffer.

NBT (nitro blue tetrazolium chloride) (2,24mM)→φωτοευαίσθητο: 0,1832gr σε 100ml

Phosphate Buffer

Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Xanthine: 0,0045g σε 25ml Phosphate Buffer. Θέλει θέρμανση (HEAT).

Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

Οξειδάση της Ξανθίνης (60mU): Έχουμε stock 25 U. Κάνουμε μία ενδιάμεση αραιώση και φτάνουμε στα 0,6 U, οπότε όταν πάρουμε τελικό όγκο 100μl, σε τελικό όγκο 1ml, να έχουμε 0,06U (60 mU). Πιο συγκεκριμένα, γίνεται αραιώση της ποσότητας με διάλυμα DETAPAC.

Παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Η συνολική αραίωση στην μέθοδο αυτή είναι 1:14 (αραίωση ομογενοποίησης 1:4 και αραίωση SOD 1:10).

- Μηδενίζω το φωτόμετρο στα 560nm με το BLANK, το οποίο περιέχει 800μl Master Mix και 100μl DETAPAC buffer.
- Βγάζω την κυβελίδα και μηδενίζω ξανά το φωτόμετρο. Έπειτα, προσθέτω στην κυβελίδα 100μl ενζύμου οξειδάσης της ξανθίνης και μετράω μεταβολή της απορρόφησης για 3 λεπτά.
- Ακολούθως, γίνεται η ίδια διαδικασία και για τα δείγματα, όπου αντί για 100μl DETAPAC buffer προσθέτω 100μl ιστού.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Ο υπολογισμός της δραστηρότητας του SOD στα δείγματα βασίστηκαν στο ποσοστό επί τοις εκατό αναστολής της ταχύτητας της αύξησης της απορρόφησης.

Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης (A) ανά λεπτό για τον αρνητικό έλεγχο και για τον έλεγχο των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τον τύπο (1), και το ποσοστό της αναστολής για κάθε δείγμα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο (2):

$$\frac{\Delta A_{560 \text{ nm}}}{\text{min}} = \frac{A_{560 \text{ nm}}^{\text{final}} - A_{560 \text{ nm}}^{\text{initial}}}{3.5 \text{ min}}, \quad (1)$$

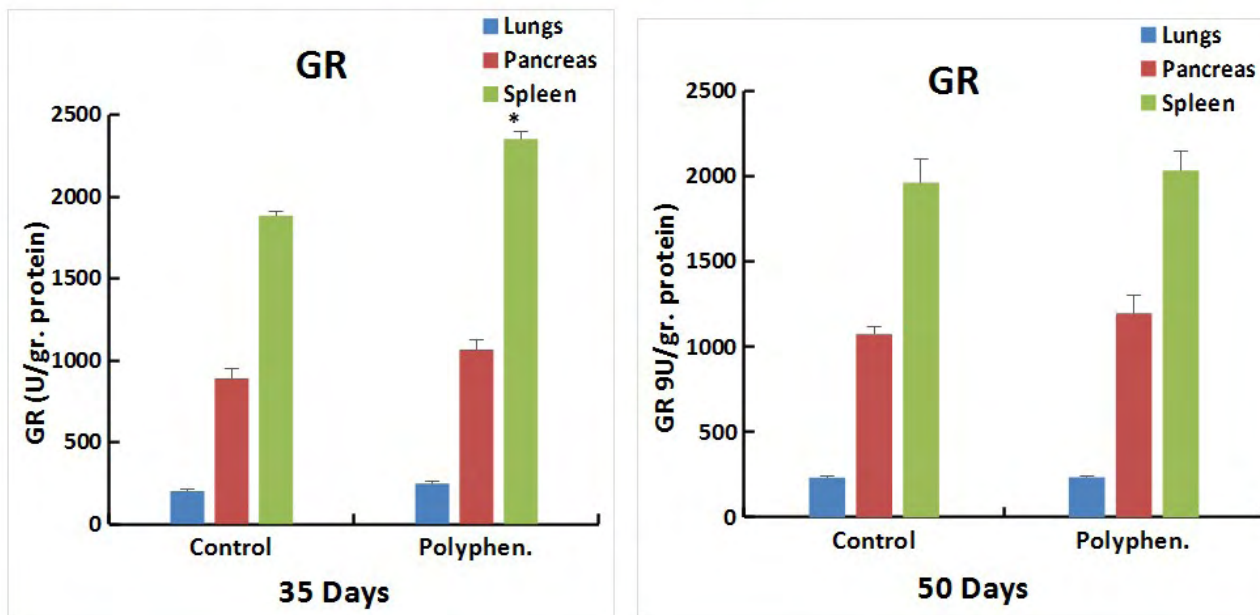
% Inhibition

$$= \left[\frac{\Delta((A_{560 \text{ nm}})/(\text{min}_{\text{negative control}})) - \Delta((A_{560 \text{ nm}})/(\text{min}_{\text{sample}}))}{\Delta((A_{560 \text{ nm}})/(\text{min}_{\text{negative control}}))} \right] \times 100. \quad (2)$$

Εικόνα 21. Τύποι για προσδιορισμό αρνητικού ελέγχου και για ποσοστό αναστολής

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προσδιορισμός της Αναγωγής της Γλουταθειόνης (GR)



Γράφημα 1. GR στον Πνευμονικό, Παγκρεατικό και ιστό Σπλήνας των Χοιριδίων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων της GR (U/mg protein).

GR ΠΕΥΜΟΝΙΚΟΣ			GR ΠΑΓΚΡΕΑΣ			GR ΣΠΛΗΝΑΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
Control 35d	201,13	8,72	Control	890,06	62,11	Control	1882,93	27,43
Polyphen 35d	248,56	10,04	Polyphen.	1065,99	62,37	Polyphen.	2351,04	43,57
Control 50d	231,97	8,87	Control	1073,85	44,20	Control	1961,76	140,17
Polyphen. 50d	235,07	4,01	Polyphen.	1195,70	106,18	Polyphen.	2033,76	114,11

Πίνακες 7,8 και 9. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα Controls.

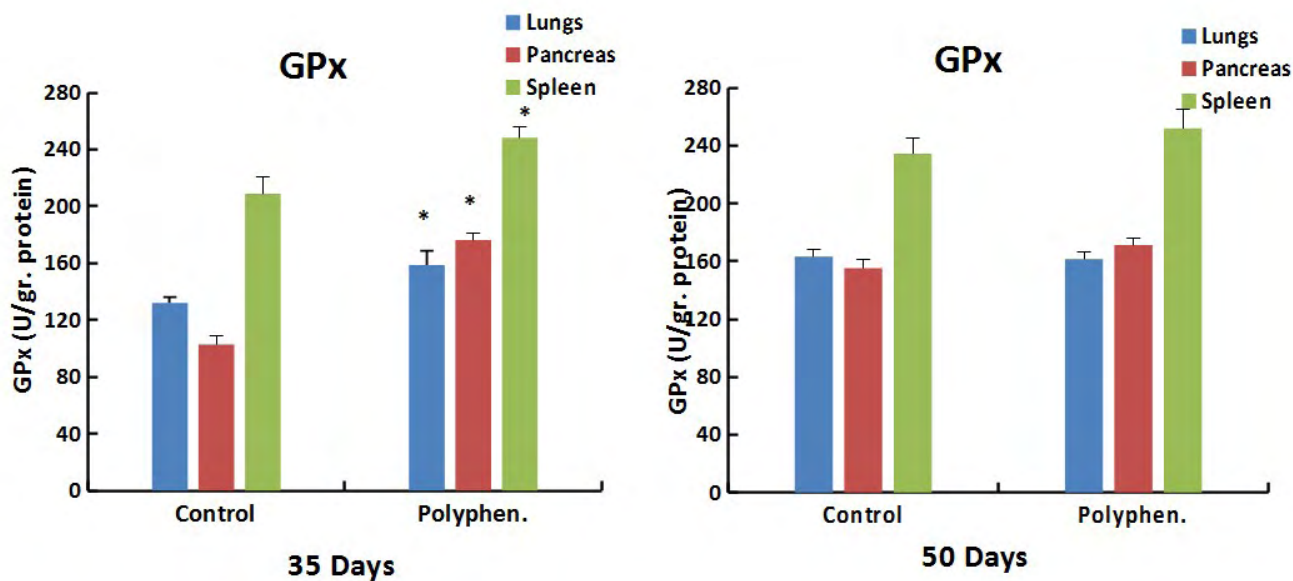
	Πνευμονικός	
	35d	50d
Polyphen.	23,6	1,3

	Παγκρεατικός	
	35d	50d
Polyphen.	19,8	11,3

	Σπλήνας	
	35d	50d
Polyphen.	24,9	3,7

Από το γράφημα 1 και τους πίνακες 7,8 και 9 παρατηρείται ότι στα δείγματα ελέγχου των 50 ημερών χοιριδίων υπάρχει μια μικρή αύξηση σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου των 35 ημερών χοιριδίων. Αυτό σημαίνει ότι στους 50 ημερών χοίρους η ενεργότητα της GR είναι αυξημένη. Επίσης, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τα δείγματα ελέγχου και τα δείγματα που τους χορηγήθηκαν πολυφαινόλες, ούτε στον 35 ημερών ούτε και στον 50 ημερών χοίρων. Υπάρχει μόνο μια μικρή αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στον ιστό σπλήνα των 35 ημερών ζώων που τους χορηγήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα. Το ίδιο συμβαίνει και στα δείγματα με χορήγηση πολυφαινολικών, δηλαδή δεν παρατηρείται καμιά στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα 35 ημερών και 50 ημερών.

3.2.GPx – Glutathione Peroxidase



Γράφημα 2. GPx στον Πνευμονικό, Παγκρεατικό και ιστό Σπλήνας των Χοιριδίων.
*p < 0,05 σε σύγκριση με το Control.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων της GPx (U/mg protein).

GPx ΠΕΥΜΟΝΙΚΟΣ			GPx ΠΑΓΚΡΕΑΣ			GPx ΣΠΛΗΝΑΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
Control 35d	132,08	4,37	Control	102,88	5,73	Control	208,75	12,16
Polyphen 35d	158,59	9,79	Polyphen.	176,21	4,46	Polyphen.	248,23	7,99
Control 50d	163,23	4,68	Control	155,26	5,88	Control	234,48	10,56
Polyphen. 50d	161,58	4,56	Polyphen.	171,14	4,86	Polyphen.	252,04	13,29

Πίνακες 11,12 και 13. Αύξηση GPx % σε σχέση με Control.

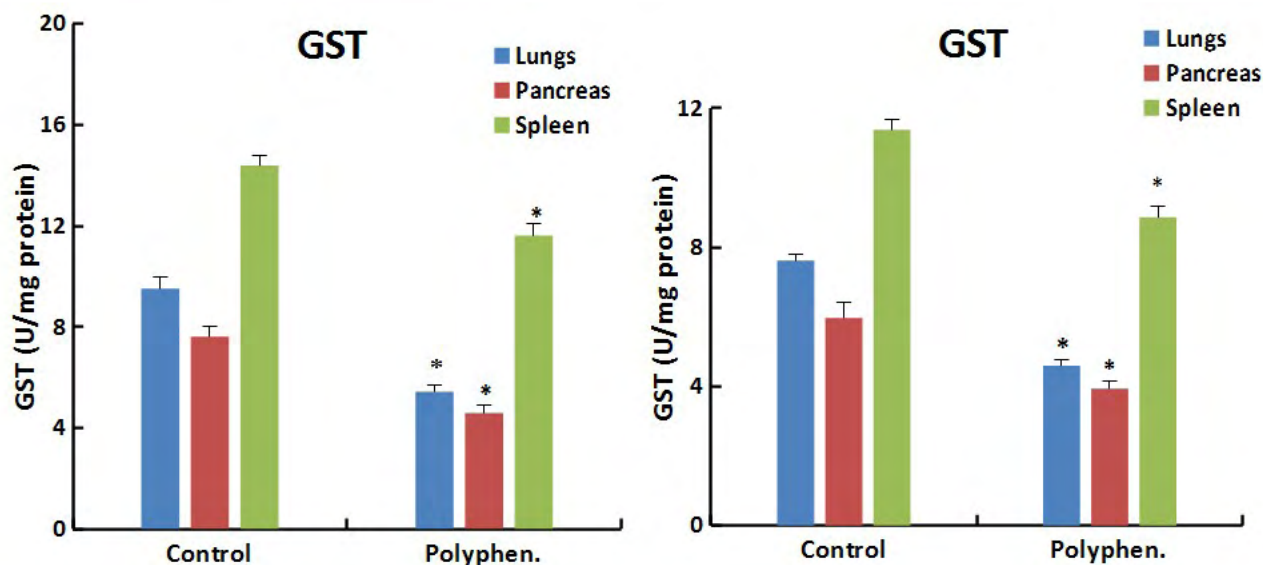
	Πνευμονικός	
	35d	50d
Polyphen.	20,0	1,01

	Παγκρεατικός	
	35d	50d
Polyphen.	71,3	10,3

	Σπλήνας	
	35d	50d
Polyphen.	18,9	7,5

Συγκρίνοντας τα δείγματα ελέγχου, παρατηρείται αύξηση την ενεργότητας της GPx στα ζώα ελέγχου των 50 ημερών. Επιπλέον, συγκρίνοντας την δράση των πολυφαινολών, δεν παρατηρείται σχεδόν καμία στατιστική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες ζώων. Αντίθετα, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του ενζύμου στα ζώα 35 ημερών μετά από χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος και στους 3 ιστούς που μελετήθηκαν. Το ίδιο όμως δεν συμβαίνει στον 50 ημερών ζώων αφού μετά από χορήγηση πολυφαινολών δεν παρατηρείται διαφορά στην συγκέντρωση του ενζύμου.

3.3. Glutathione S-Transferase



Γράφημα 3. GST στον Πνευμονικό, Παγκρεατικό και ιστό Σπλήνας των Χοιριδίων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα μετρήσεων της GST (U/mg protein).

GST ΠΕΥΜΟΝΙΚΟΣ			GST ΠΑΓΚΡΕΑΣ			GST ΣΠΛΗΝΑΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
Control 35d	9,51	0,48	Control	7,61	0,42	Control	14,39	0,37
Polyphen 35d	5,44	0,23	Polyphen.	4,58	0,29	Polyphen.	11,61	0,48
Control 50d	7,61	0,18	Control	5,97	0,46	Control	11,37	0,30
Polyphen. 50d	4,59	0,17	Polyphen.	3,93	0,23	Polyphen.	8,86	0,33

Πίνακες 15,16 και 17. Μείωση GST % σε σχέση με Control.

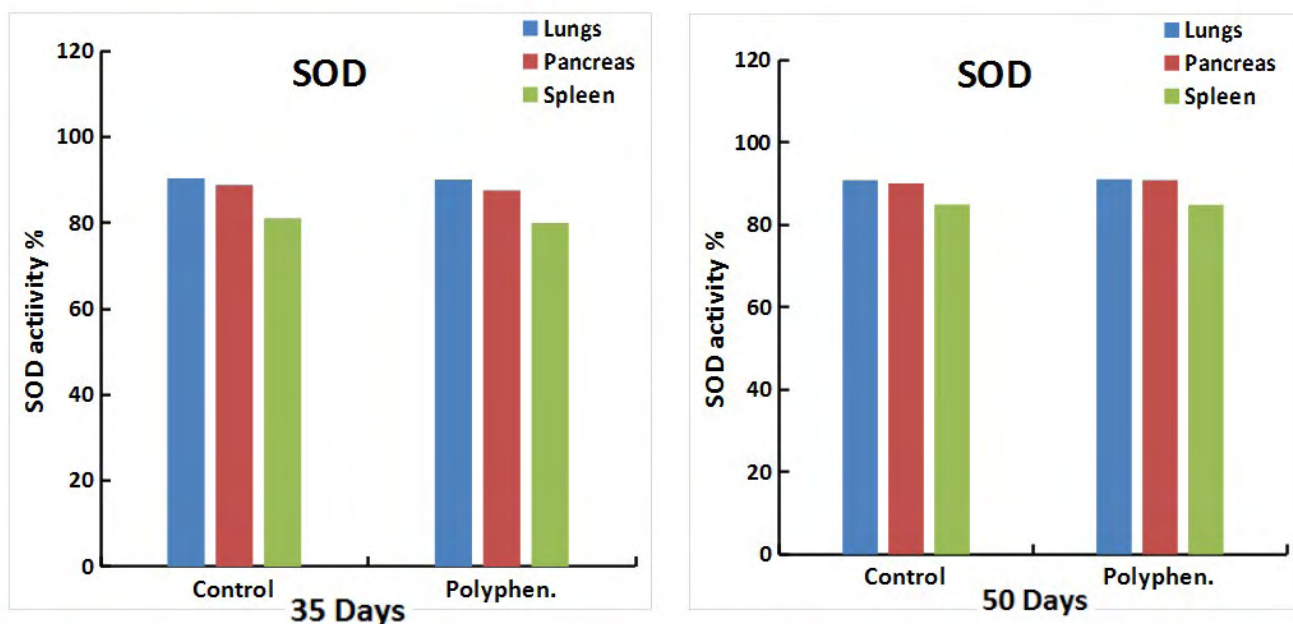
	Πνευμονικός	
	35d	50d
Polyphen.	-42,8	-37,9

	Παγκρεατικός	
	35d	50d
Polyphen.	-39,8	-34,2

	Σπλήνας	
	35d	50d
Polyphen.	-19,3	-22,0

Παρατηρώντας τα δείγματα ελέγχου και στις 2 ομάδες ζώων (35 και 50 ημερών) δεν υπάρχει στατιστική διαφορά, όπως ούτε και στα δείγματα που τους χορηγήθηκαν πολυφαινολικό εκχύλισμα. Αντίθετα, όσο και στον 35 ημερών τόσο και στον 50 ημερών ζώων παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου στα ζώα που τους χορηγήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου και στους 3 ιστούς.

3.4. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)



Γράφημα 4. SOD στον Πνευμονικό, Παγκρεατικό και ιστό Σπλήνας των Χοιριδίων.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα μετρήσεων της SOD (U/mg protein).

SOD ΠΕΥΜΟΝΙΚΟΣ			SOD ΠΑΓΚΡΕΑΣ			SOD ΣΠΛΗΝΑΣ		
GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM	GROUP	M.O	SEM
Control 35d	90,40	0,54	Control	88,84	1,07	Control	88,84	1,56
Polyphen 35d	90,08	0,72	Polyphen.	87,54	0,43	Polyphen.	87,54	0,99
Control 50d	90,84	0,44	Control	90,05	0,74	Control	90,05	0,43
Polyphen. 50d	91,05	0,58	Polyphen.	90,80	0,19	Polyphen.	90,80	0,94

Πίνακες 19,20 και 21. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα Controls.

	Πνευμονικός	
	35d	50d
Polyphen.	-0,3	0,2

	Παγκρεατικός	
	35d	50d
Polyphen.	-1,5	0,8

	Σπλήνας	
	35d	50d
Polyphen.	-1,4	-0,02

Συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου των 35 ημερών ζώων και των 50 ημερών ζώων δεν παρατηρείται καμία στατιστική διαφορά όσον αφορά την ενεργότητα του ενζύμου. Επίσης, το ίδιο παρατηρείται και ανάμεσα στους χοίρους που τους χορηγήθηκε ζωοτροφή με πολυφαινολικό εκχύλισμα, καθώς και συγκριτικά ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα που τους χορηγήθηκαν πολυφαινόλες. Επομένως, οι πολυφαινόλες δεν επηρεάζουν την ενεργότητα και την συγκέντρωση του ενζύμου SOD.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση χοιριδίων κρεατοπαραγωγής μετά από χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος σε ζωοτροφή, το οποίο προκύπτει από την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από την ελιά. Οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν ο πνευμονικός ιστός, ο παγκρεατικός ιστός και ιστός από σπλήνα, στους οποίους έγινε προσδιορισμός των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR), η Περοξειδάση της Γλουταθειόνης (GPx), η S- Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης (GST) και η Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD).

Έτσι, δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των συγκεκριμένων ιστών στα χοιρίδια, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των χοιριδίων της ομάδας ελέγχου (χοιρίδια που δεν λάμβαναν την πολυφαινολική σκόνη) και των πολυφαινολικών ομάδων (χοιρίδια που λάμβαναν πολυφαινολική σκόνη) είτε μεταξύ των χοιριδίων των πολυφαινολικών ομάδων, δηλαδή μεταξύ των χοιριδίων 35 ημερών και 50 ημερών.

Οι δείκτες αυτοί μελετήθηκαν, διότι αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et al., 1964) (Hughesetal., 1989) και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή. Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνόςύνθεση, η σύνθεση προσταγλανδίνης, η μεταφορά αμινοξέων και η ενεργοποίηση ενζύμων. Ζωτική είναι επίσης η δράση της στον μεταβολισμό του σιδήρου. Στα ζώα η γλουταθειόνη δρα ως υπόστρωμα σε συζευκτικές και αναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυμικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες.

Αξιολογώντας, λοιπόν τα αποτελέσματα της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR), παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμιά σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων όπου τους χορηγήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου. Αξίζει να σημειωθεί ότι περισσότερη ενεργότητα του ενζύμου καταγράφηκε στον ιστό του σπλήνα, ενώ χαμηλότερη βρέθηκε να είναι στον πνευμονικό ιστό.

Παρόλα αυτά, το μόνο αξιοσημείωτο είναι ότι παρατηρείται μια μικρή αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στην ομάδα των ζώων των 35 ημερών, όπου στα ζώα τους χορηγήθηκε η διαίτα με πολυφαινολικό εκχύλισμα. Έτσι, διαπιστώνεται ότι στον ιστό σπλήνα στα νεαρά χοιρίδια οι πολυφαινόλες αυξάνουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) είναι η γενική ονομασία μιας οικογένειας ενζύμων με δράση υπεροξειδάσης, της οποίας κύριος βιολογικός ρόλος είναι η προστασία του οργανισμού από οξειδωτική βλάβη. Η βιοχημική λειτουργία της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης είναι η μετατροπή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους και η μείωση του ελεύθερου υπεροξειδίου του υδρογόνου στο νερό. Η χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της παραγωγής και ενεργότητας του ενζύμου, αφού αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της και στους τρεις ιστούς. Ωστόσο, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην 35 ημερών ομάδα χοιριδίων, ενώ αντίθετα στην 50 ημερών ομάδα δεν φάνηκε να υπάρχει σημαντική αύξηση. Το γεγονός αυτό οφείλεται ότι στα νεαρά ζώα υπάρχει περισσότερη ανάγκη για ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω του ότι δεν είναι ακόμη καλά ανεπτυγμένοι στον οργανισμό. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μελέτες έχουν δείξει ότι δύο πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ και η ελευρωπαΐνη, αυξάνουν την έκφραση και τη δραστηριότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της άμεσης απομάκρυνσης των ROS. Με αυτό τον τρόπο συνεισφέρουν στη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης. (Gerasopoulos et al., 2015)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν έναν μεγάλο αριθμό υδρόφοβων ενώσεων και να καταλύουν την αντίδραση διασύνδεσης της GSH με αυτές, δίνοντας σύμπλοκα της ένωσης με τη GSH. Είναι προφανές ότι ο φυσιολογικός ρόλος αυτής της συγκεκριμένης ομάδας ενζύμων είναι η προστασία των κυττάρων από επικίνδυνα ξενοβιοτικά τα οποία είτε εισέρχονται απευθείας από το περιβάλλον είτε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού τους, παραδείγματος χάριν, μέσω του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Είναι γνωστό ότι πολλά από τα εν λόγω ξενοβιοτικά έχουν την ικανότητα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στα κύτταρα και, κατά συνέπεια, η δράση των GST είναι προστατευτική. Η σύνδεση των ξενοβιοτικών με τη γλουταθειόνη αποτελεί συνήθως το πρώτο βήμα για την αποτοξίνωσή τους. Μερικές φορές, όμως, συμβαίνει το σχηματιζόμενο προϊόν να είναι πιο τοξικό από την αρχική ένωση. Παραδείγματος χάριν, τα σύμπλοκα της γλουταθειόνης με μια σειρά αλογονωμένους υδρογονάνθρακες όπως το διβρωμο- ή το διχλωρομεθάνιο αποτελούν εξαιρετικά νεφροτοξικούς παράγοντες. Στην παρούσα εργασία, η χορήγηση τροφής με πολυφαινολικό εκχύλισμα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας αυτών των ενζύμων σε σχέση με τα ζώα ελέγχου.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση την ενεργότητας του ενζύμου τόσο στην 35 ημερών ομάδα, όσο και στην 50 ημερών ομάδα ζώων που τους χορηγήθηκε η δίαιτα. Στον πνευμονικό ιστό υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό μείωσης του ενζύμου, 42,8% στην ομάδα των 35 ημερών και 39,7% στην ομάδα των 50 ημερών. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε και στον παγκρεατικό ιστό, όπου υπήρξε μείωση κατά 39,8% στην ομάδα των 35 ημερών και 34,2% στην ομάδα των 50 ημερών. Στο ιστό του σπλήνα αν και η παρατηρούμενη μείωση ήταν μικρότερη, παραμένει σημαντική γιατί ήταν 19,3% στην ομάδα των 35 ημερών και 22,0% στην ομάδα των 50 ημερών. Συμπερασματικά, η μείωση της GST μπορεί να οφείλεται στο ότι το εκχύλισμα με τις πολυφαινόλες από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων επιφέρουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται να δράσει το συγκεκριμένο ένζυμο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση του ενζύμου GST μπορεί να οφείλεται στο γεγονός της αύξησης της ενεργότητας του ενζύμου GPx κυρίως στα ζώα 35 ημερών, δηλαδή λόγω της αύξησης της ενεργότητας της GPx να καταναλώθηκε GSH, και αυτό να οδήγησε στην μείωση των επιπέδων της δράσης των GST.

Η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα ένζυμο που εναλλάσσει καταλυτικά τη διάσπαση (ή διαχωρισμό) της ρίζας υπεροξειδίου είτε στο συνηθισμένο μοριακό οξυγόνο είτε στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το υπεροξείδιο παράγεται ως παραπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και, εάν δεν ρυθμίζεται, προκαλεί πολλούς τύπους κυτταρικών βλαβών. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι επίσης επιβλαβές και αποικοδομείται από άλλα ένζυμα όπως η καταλάση. Έτσι, το SOD είναι μια σημαντική αντιοξειδωτική άμυνα σε σχεδόν όλα τα ζωντανά κύτταρα που εκτίθενται στο οξυγόνο. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από το παρόν πείραμα είναι ότι η δραστηριότητα της (SOD) δεν μεταβάλλεται σχεδόν καθόλου μετά από την χορήγηση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος σε καμιά ομάδα χοιριδίων και σε κανέναν ιστό, δηλαδή δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα ζώα ελέγχου.

Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, μελετήθηκε η επίδραση της σκόνης πολυφαινολικού εκχυλίσματος στους βιολογικούς δείκτες οξειδωτικού στρες: Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων (CARB), Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC), Καταλάση (CAT) και Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH).

Στον παγκρεατικό ιστό, μετά την χορήγηση εκχυλίσματος με πολυφαινόλες τόσο σε ομάδα ζώων 35 ημερών όσο και σε ομάδα ζώων 50 ημερών, διαπιστώθηκε η μεγάλη αύξηση της ενεργότητας της GSH, καθώς και της CAT και μια μικρή αύξηση της TAC. Αντίθετα, στα πρωτεϊνικά καρβονύλια και στα TBARS παρατηρήθηκε μια μείωση στην δράση τους. Άρα συμπεραίνουμε ότι οι πολυφαινόλες βοηθούν στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης στο πάγκρεας.

Αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν ότι στον σπλήνα στους συγκεκριμένους δείκτες διαπιστώθηκε η σημαντική αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης, ενώ τα επίπεδα του ενζύμου καταλάσης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν μεταβάλλονται έπειτα από χορήγηση πολυφαινόλων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η μείωση των επιπέδων των TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Η μείωση των επιπέδων TBARS στον σπλήνα μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση της GSH, η οποία συμβάλλει στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών, με αποτέλεσμα την μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στην μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων (Gerasopoulos et al. 2015).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η υπεροξειδική δισμουτάση(SOD) και η καταλάση είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα του κυτταρικού αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος (Etienne Pigeolet et al. 1989). Πιο συγκεκριμένα, η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση μπορούν να παρέχουν προστασία έναντι της τοξικότητας του οξυγόνου στα κύτταρα (J. F. Turrens et al. 1984). Παρόλα αυτά, η χορήγηση πολυφαινόλων στους υπό μελέτη ιστούς δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα των ενζύμων αυτών σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων, στα οποία η δραστηριότητα τους αυξάνεται σημαντικά κατά τα αρχικά στάδια της οξειδωσης των ιστών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά να μην χρειάζονται να αναλάβουν δράση στους συγκεκριμένους ιστούς. Ένας άλλος πιθανός λόγος που δεν μεταβάλλονται τα επίπεδα δραστηριότητας των δύο αυτών ενζύμων είναι γιατί τα αρχικά επίπεδα συγκέντρωσης τους είναι πολύ υψηλά στους ιστούς συγκριτικά με τα υπόλοιπα υπό μελέτη ένζυμα και έτσι μπορούν να συμβάλλουν στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με τις αρχικές τους συγκεντρώσεις.

Επιπλέον, σε άλλες μελέτες του εργαστηρίου διαπιστώθηκε ότι το κάθε ένζυμο δρα διαφορετικά σε κάθε ιστό. Μελέτες που έγιναν σε πρόβατα, έδειξαν ότι η χορήγηση αυτή της πολυφαινολικής σκόνης από απόβλητα ελαιοτριβείου επηρεάζει τα επίπεδα των ενζύμων GST και SOD. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα της GST σε καρδιακό ιστό αυξάνονται σε μεγαλύτερης ηλικίας πρόβατα, ενώ αντίθετα σε πιο νεαρής ηλικίας ζώων τα επίπεδα της GST μειώνονται. Επιπλέον, σε ιστούς ήπαρ, σπλήνα και τετρακέφαλο μυ, η δραστηριότητα της GST αυξάνεται, ενώ δεν παρατηρείται καμιά σημαντική μεταβολή των επιπέδων της στον εγκέφαλο. Επίσης, κάτι αξιοπερίεργο είναι και η δράση του ενζύμου SOD, όπου σε ιστούς καρδιάς, σπλήνα, ήπαρ, εγκέφαλο και τετρακέφαλου μυ προβάτων δεν μεταβάλλεται, δηλαδή δεν υπάρχει καμιά στατιστική μεταβολή των επιπέδων της σε σχέση με πρόβατα τα οποία δεν έλαβαν πολυφαινολικό εκχύλισμα.

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. Στους περισσότερους ιστούς (σπλήνας, τετρακέφαλος μυς, καρδιά, ήπαρ), τα αυξημένα επίπεδα της GST σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα της GSH υποδηλώνουν αυξημένη ικανότητα αποτοξικοποίησης του ζώου και καλύτερη προστασία του. Ωστόσο, η παρατηρούμενη αύξηση της δραστηριότητας της GST θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της GSH λόγω της σύζευξης του σε ηλεκτρονιόφιλα. 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.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ενσωμάτωση πολυφαινολικής σκόνης σε ζωοτροφές χοιριδίων κρεατοπαραγωγής βοηθάει σημαντικά στη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στον οργανισμό. Η ευεργετική επίδραση των εκχυλισμάτων από εκχύλισμα απόβλητων ελαιοτριβείου βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, γενιστεΐνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, συριγλικό οξύ, π-μεθοξικουμαρικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, τρυγικό οξύ). Ως λογικό επακόλουθο, ενισχύεται η δράση όσον αφορά την αντιμετώπιση ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στα παραγωγικά ζώα και γενικότερα στην βελτιστοποίηση της ευζωίας τους. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις των ζώων εκτροφής, θεωρείται ότι σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης όμως υποστηρίζουν ότι η προσθήκη πολυφαινολικής σκόνης από απόβλητα ελαιοτριβείων στις τροφές ζώων, δεν ενισχύει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των χοιριδίων κρεατοπαραγωγής σε όλους τους ιστούς. Για αυτόν τον λόγο θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες των ενζύμων αυτών και σε άλλους ιστούς των ζώων.

Τα αποτελέσματα άλλων επιστημονικών μελετών, δείχνουν ότι η συγκεκριμένη σκόνη εκτός του ότι αυξάνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε άλλες τροφές ζώων ή ακόμη και σε ανθρώπινα τρόφιμα σε συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Επίσης, η χρήση της πολυφαινολικής σκόνης και ιδιαίτερα των υποπροϊόντων από την διαδικασία παρασκευής της, που μελετήθηκε στο πρόσφατο παρελθόν (Gerasopoulos et al., 2015), θα μπορούσε να είναι μία καλή λύση στα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Battin, T.J., Luysaert, S., Kaplan, L.A., Aufdenkampe, A.K., Richter, A., Tranvik, L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*.
- Bhabak KP, Mugesh G (Nov 2010). "Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants". *Accounts of Chemical Research*. 43 (11): 1408–19.
- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J. P., & Seve, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2256–2262.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <http://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Boyer TD (March 1989). "The glutathione S-transferases: an update". *Hepatology*. 9(3): 486–496. [PMID 2646197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2646197/). doi:10.1002/hep.1840090324
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–33.
- Bradford M.M 1976 A rapid sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein- Dye Binding. *Anal Biochem* (72:248-254).
- Castaner, O., Fito, M., Lopez-Sabater, M. C., Poulsen, H. E., Nyssonen, K., Schroder, H., ... Covas, M.-I. (2011). The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 30(4), 490–493. <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.01.013>
- Corpas FJ et. al., 2006. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves.
- Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. *R. Bras. Zootec.* v.39, pp.348-363.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218–236. <http://doi.org/10.1080/10408390701856223>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10), 1195–214.

- Chelikani P1, Fita I, Loewen PC.(2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jan;61(2):192-208.
- DANIEL L. GILBERT, January 2000, Fifty Years of Radical Ideas.
- Etienne Pigeolet et al., 1989. Glutathione peroxidase, superoxidase dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002.Free radicals, antioxidants, and nutrition.*Nutrition*, 18(10),pp.872–879. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-121.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Petrotos, K., et al., 2015. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, pp.319–327.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Krouezas, A., Karaveli, C., Barda, C., Gkika, H., ... Kouretas, D. (n.d.). Assessment of Fatty Acid Allocation in Plasma and Tissues in Piglets, Using Feed Supplemented with Byproducts from Processed Olive Mill Wastewater In Vivo(Athens, Greece), 30(3), 291–301.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., et al., 2015. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 82, pp.42–49.
- Gerogianni, I., Gourgoulianis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases.*Archives of Hellenic Medicine.*23(5), pp.444–454.
- Giacosa, A., Barale, R., Bavaresco, L., Gatenby, P., Gerbi, V., Janssens, J., ... Rondanelli, M. (2013). Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(1), 90–95. <http://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7>
- Guiso, M., & Marra, C. (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural Product Research*, 19(2), 105–109. <http://doi.org/10.1080/14786410410001696147>
- Halliwell B. & Gutteridge JM., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
- Hayyan, M., Hashim, M.A. &AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), pp.3029–3085.
- Jain, A., & Flora, S. J. S. (2012). Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, 33(2), 233–238.

- Jie Yin, Mingfeng Ren et al. 2015.Effects of Dietary Supplementation with Glutamate and Aspartate on Diquat-Induced Oxidative Stress in Piglets. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0122893>
- J F Turrens et al., 1984. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxidase dismutase.
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, 128, 749–758. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.027>
- Kafantaris I., Stagkos D., et al., 2017. Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters.
- Khallouki, F. et al., 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), pp.67–75.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- L. W. Oberley and D. R. Spritz, 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue, *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 457-464.
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 173(3), 502–511. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>
- Manach, C. et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 326S–329. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/81/1/326S>
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska, E., & Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812–2823. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77620-1](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1)
- Muller, F.L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp.477–503.
- Mukanganyama S, Bezabih M, Robert M, et al. (August 2011). "The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1". *J Enzyme Inhib Med Chem*. 26 (4): 460–467. [PMID 21028940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21028940/). [doi:10.3109/14756366.2010.526769](https://doi.org/10.3109/14756366.2010.526769).
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H (Aug 2007). "Trends in oxidative aging theories". *Free Radical Biology & Medicine*. 43 (4): 477–503.

- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999.Lipid peroxidation and tissue damage.In vivo (Athens, Greece), 13(3), pp.295–309.
- Oakley A (May 2011). "Glutathione transferases: a structural perspective". Drug Metab. Rev. 43 (2): 138– 151. [PMID 21428697](#). [doi:10.3109/03602532.2011.558093](#)
- Pastore et al. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin Chim Acta. 2003 Jul 1;333(1):19-39.
- Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G, Georgiou C.D, Matsokis N.A, Panagopoulos N.T (2005). Thiol redox state and oxidative stress in midbrain and striatum of weaver mutant mice, a genetic model of nigrostriatal dopamine deficiency. Neurosci Lett. 376(1):24-8
- Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 18 June 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, Nature 459, 996-999
- Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European journal of medicinal chemistry, 97, pp.55–74.
- Poljsak, B., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress.Oxidative medicine and cellular longevity, 2011, p.194586.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rinnerthaler, M. et al., 2015.Oxidative stress in aging human skin.Biomolecules, 5(2), pp.545–589.
- Sengupta, A., Ghosh, S. &Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 5(3), pp.237–245.
- Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases.Critical reviews in food science and nutrition, 45(4), pp.287–306.
- Scholz, R.W., Graham, K.S., Gumpricht, E., Reddy, C.C., 1989.Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation.Ann NY Acad Sci. 570, pp.514–7.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M. et al., 2007.Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1), pp.44–84.
- Weiss, W. P., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (2004). Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. Journal of Dairy Science, 87(1), 32–37. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73138-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73138-0)

•Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., ... Imai, K. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*, 83(1), 35–44.
<http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.002>

•Παπαγάλανης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. *Δραστικέςρίζεσοξυγόνου.* , 26(3), pp.151–194.

•ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ