

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ  
ΙΣΤΟΥΣ (ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ-ΚΑΡΔΙΑ) ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ  
ΧΟΙΡΙΔΙΩΝ ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ  
ΤΡΟΦΗΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΗ ΜΕ ΠΡΩΤΕΙΝΗ  
ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ (WHEY)**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGLET  
TISSUES (QUADRICEPS AND HEART) AND PLASMA BLOOD  
AFTER ADMINISTRATION OF FEED ENRICHED WITH WHEY  
PROTEIN**

**ΝΙΚΟΛΗΜΟΣ ΜΟΣΧΟΝΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

**Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να εκπονήσω το εν λόγω θέμα και να συνεργαστώ με το εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την υποστήριξη του στα εργαστηριακά πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας καθώς και για τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ επιπρόσθετα τον διδάκτορα Γιάννη Καφαντάρη για την υλική και ηθική στήριξη και την καθοδήγηση που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον την ομάδα του εργαστηρίου για την συνεργασία και ιδιαίτερα τους διδάκτορες Κωνσταντίνο Γερασόπουλο και Νίκο Γκουτζουρέλα που συνέβαλαν ουσιαστικά στην πραγματοποίηση του πειράματος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τους φίλους μου για την στήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια και με βοήθησαν να εξελιχτώ ως άνθρωπος και ως επιστήμονας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</b> .....	2
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	8
1.1.1 Σχηματισμός και αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. ....	9
1.1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου(ROS) (ΔΜΟ) .....	10
1.1.3 Μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	11
1.1.4 Κυτταροπλασματική παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου.....	13
1.1.5 Ενζυμικά Συστήματα NOX και DUOX-οξειδασών.....	14
1.2 Οξειδωτικό στρες.....	16
1.3 Αντιοξειδωτικά .....	19
1.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	19
1.3.2 Μη ενζυμικά Αντιοξειδωτικά .....	22
1.5 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein).....	29
1.5.1 Παραγωγή πρωτεΐνης τυρογάλακτος.....	30
1.5.2 Χημική σύσταση και αντιοξειδωτική ικανότητα της whey πρωτεΐνης .....	31
1.6 Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια .....	33
1.6.1 Εκτροφή χοίρων .....	34
2. Σκοπός .....	36
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	37
3.1 Γενικά.....	37
3.1.1 Παραγωγικά Χαρακτηριστικά .....	39
3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου .....	40
3.2.1 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών .....	40
3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος.....	40
3.2.3 Παρασκευή Ενσιρώματος Καλαμποκιού .....	41
3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων.....	42
3.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (in vitro) των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα νεαρά χοιρίδια.....	43
3.3 Ιστοληψία - Αιμοληψία .....	44
3.3.1 Επεξεργασία αίματος .....	45
3.3.2 Ομογενοποίηση ιστών.....	47

3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες .....	48
3.4.1 Γενικά.....	48
3.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης.....	48
3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης .....	52
3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) .....	55
3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) .....	59
3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια.....	61
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	64
<b>4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τους χοίρους.....</b>	<b>65</b>
4.1.1 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman .....	68
4.2 Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών χοιριδίων.....	70
<b>4.2 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (καρδιά, τετρακέφαλος) στους χοίρους.....</b>	<b>73</b>
4.2.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	74
4.2.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα .....	75
4.2.3 Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα.....	77
4.2.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα.....	78
4.2.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα .....	80
4.2.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον τετρακέφαλο ιστό .....	81
4.2.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον τετρακέφαλο ιστό .....	83
4.2.8 Επίπεδα των TBARS στον τετρακέφαλο ιστό .....	85
4.2.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό .....	87
4.2.10 Επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο ιστό .....	88
4.2.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον καρδιακό ιστό.....	90
4.2.12 Επίπεδα Καταλάσης στον καρδιακό ιστό.....	91
4.2.13 Επίπεδα των TBARS στον καρδιακό ιστό .....	93
4.2.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό .....	95
4.2.15 Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό .....	96
4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (τετρακέφαλος, καρδιά) των χοιριδίων .....	98
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>100</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>108</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε εκτροφή οικόσιτων χοίρων που προήλθαν από τη διασταύρωση Landrace με Large White – Duroc – Pietrain και διεξήχθησαν 4 ιστοληψίες-αιμοληψίες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά τους στάδια, ώστε να γίνει έλεγχος της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης στο μυϊκό ιστό, στον καρδιακό ιστό και στο αίμα. Οι πρώτες 2 ιστοληψίες διεξήχθησαν κατά την πρόωρη ηλικία (2η και 20η μέρα), περίοδο κατά την οποία καταλάωναν μόνο το μητρικό γάλα. Οι άλλες 2 ιστοληψίες αφορούσαν τις περιόδους μερικού (35η μέρα) και πλήρους απογαλακτισμού (50η μέρα), κατά τις οποίες τα εναπομείναντα χοιρίδια ήταν χωρισμένα σε δύο ομάδες ανάλογα με το πειραματικό σιτηρέσιο που καταλάωναν. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, ενώ η δεύτερη την ομάδα whey, η τροφή της οποίας περιείχε πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, τόσο στους προαναφερθέντες ιστούς όσο και στο αίμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα δραστικότητας της CAT (30,62% στις 35 ημέρες), της TAC (12,82% στις 35 ημέρες) και μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (28,85% και 21,14% στις 35 και 50 ημέρες) στο αίμα. Στους ιστούς, τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν (34,54% στις 35 ημέρες και 27,74% και 23,45% στις 35 και 50 ημέρες) στον τετρακέφαλο και καρδιακό ιστό αντίστοιχα, τα επίπεδα της TAC μειώθηκαν (19,81% στις 50 ημέρες) στον καρδιακό ιστό ενώ τα επίπεδα της καταλάσης μειώθηκαν (48,22% στις 35 ημέρες) και αυξήθηκαν (62,03% στις 50 ημέρες) στον μυϊκό ιστό. Τα TBARS μειώθηκαν (40,44% στις 35 ημέρες και 30,25% και 27,81% στις 35 και 50 ημέρες) στον μυϊκό και καρδιακό ιστό αντίστοιχα, ενώ τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώθηκαν (26,88% και 21,52% στις 50 ημέρες) στον μυϊκό και καρδιακό ιστό αντίστοιχα. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί η επιρροή της πρωτεΐνης τυρογάλακτος, καθώς και ο μηχανισμός δράσης στους επιμέρους ιστούς. Ωστόσο, τα πρώτα δείγματα γραφής κρίνονται θετικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια χρήση πρωτεΐνης τυρογάλακτος στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων θα επιλύσει και τα οικολογικά προβλήματα που πηγάζουν όταν αυτά εναποτίθενται αλόγιστα στο περιβάλλον.

## **ABSTRACT**

In the present study breeding of domestic pigs derived from the cross between Landrace and Large White – Duroc – Pietrain was carried out. Tissue samples were collected at specific developmental stages, in order to examine the redox status in the brain, spleen and liver tissues. The first two sample collections took place at the early age of piglets (2 and 20 days post birth), during which they were consuming only breast milk. The other two sample collections took place during the period of weaning, at days 35 and 50 post birth, respectively. During that period, the piglets were divided into two homogeneous groups depending on their experimental diet. The first group was treated with basal feed (control group), while the second group was treated with experimental feed, enriched with whey protein. Consequently, the antioxidant effects of the experimental feed were assessed by measuring the following oxidative stress biomarkers either in the aforementioned tissues or in blood: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls (CARB). According to the results, in whey group than in control group were observed decreased CAT levels (30,62% at 35d), TAC levels (12,82% at 35d) and decreased protein carbonyls levels (28,85% and 21,14% at 35 and 50d) in blood. In tissues, GSH levels were increased (34,54% at 35d and 27,74% and 23,45% at 35 and 50d) in quadriceps and heart tissue, respectively, TAC levels were decreased (19,81% at 50d) in heart tissue whereas CAT levels were decreased (48,22% at 35d) and were increased (62,03% at 50d) in quadriceps. TBARS levels were decreased (40,44% at 35d and 30,25% and 27,81% at 35 and 50d) in quadriceps and heart tissue, respectively, whereas protein carbonyls levels were decreased (26,88% and 21,52% at 50d) in quadriceps and heart tissue, respectively. Therefore, further investigations are required in order to elucidate the effects of whey protein, as well as their molecular mechanisms of action in the aforementioned tissues. The results from this study are encouraging, as apart from harnessing whey protein to improve the animals' redox status, a concomitant reduction of the environmental pollution from the aggregation of these pollutants will be observed.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερη ρίζα ονομάζουμε οποιοδήποτε άτομο (όπως οξυγόνο, άζωτο), μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, και είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπάσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιο του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. 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. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Στον οργανισμό μας συνήθως συναντάμε τις ROS.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες

Άτομο υδρογόνου	$H^{\bullet}$
Ρίζα υπεροξειδίου	$O_2^{\bullet}$
Ρίζα υδροξυλίου	$OH^{\bullet}$
Ρίζα τριχλωρομεθυλίου	$CCl_3^{\bullet}$
Υπεροξυλική ρίζα	$RO_2^{\bullet}$
Αλκοξυλική ρίζα	$RO^{\bullet}$
Οξειδία αζώτου	$NO^{\bullet}, NO_2^{\bullet}$



### 1.1.1 Σχηματισμός και αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.

Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του περιβάλλοντος μέσου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

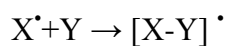
1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:  $X \rightarrow e^- + X^{\bullet+}$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:  $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού:  $A:B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$

Δύο πολύ σημαντικές αντιδράσεις στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών που οδηγούν στην παραγωγή της πολύ δραστηρικής ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου είναι:

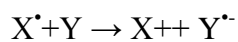
1. Αντίδραση Fenton:  $Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^{\bullet} + OH^-$
2. Αντίδραση Haber-Weiss:  $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μόρια ή άτομα με τους εξής τρόπους:

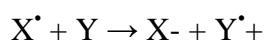
1. Προσθετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας  $OH^{\bullet}$  στη βάση γουανίνη του DNA):



2. Αναγωγικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτο της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο:

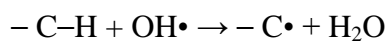


3. Οξειδωτικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο ή άτομο :



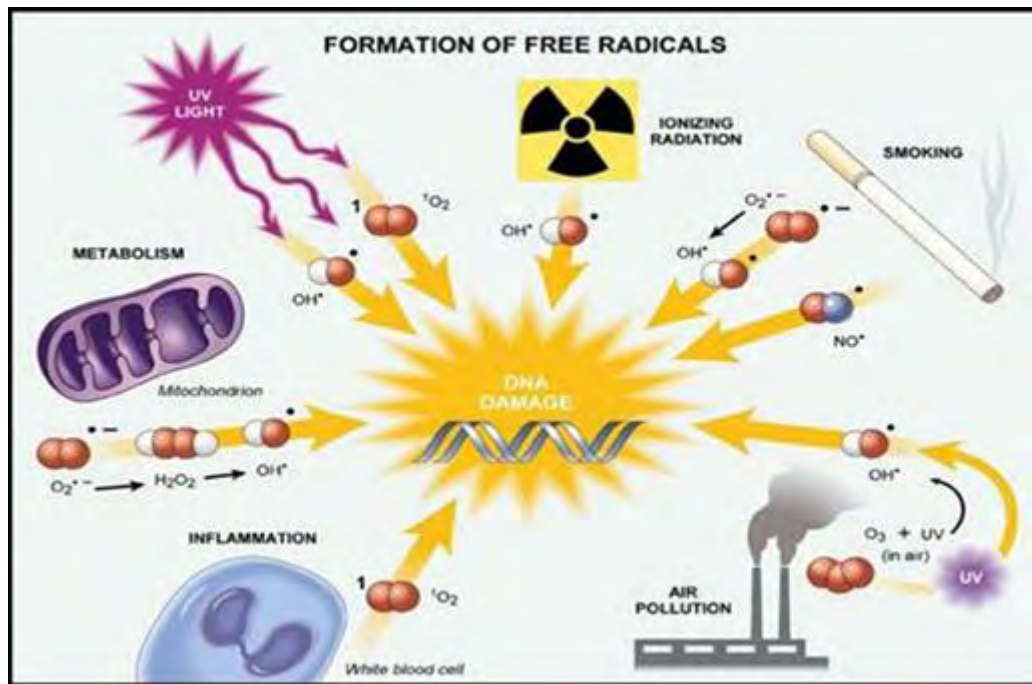
4. Αφαιρετικώς, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης είναι η προσβολή των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων από την

ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, με την οποία αρχίζει η σειρά αντιδράσεων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, που είναι ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικές μεμβράνες (Halliwell and Gutteridge, 1999):



### **1.1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου(ROS) (ΔΜΟ)**

Μια ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως οποιοδήποτε είδος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι ένας συλλογικός όρος που περιλαμβάνει και τις δύο ρίζες οξυγόνου, όπως υπεροξειδίο ( $O_2^{\cdot -}$ ), υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), υπεροξυλίου ( $RO_2^{\cdot}$ ), και την Υδροϋπεροξυλική ρίζα ( $HO_2^{\cdot}$ ), και ορισμένους οξειδωτικούς παράγοντες που δεν αποτελούν ρίζες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), και το όζον ( $O_3$ ), που μπορούν να μετατραπούν εύκολα σε ρίζες. Τα δραστικά αυτά παράγωγα του οξυγόνου σχηματίζονται αναπόφευκτα στο πλαίσιο του αερόβιου μεταβολισμού (σε ποσότητες βέβαια που ποικίλουν ανάλογα με τα επίπεδα του οξυγόνου και την όλη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων) και αποτελούν το πρωταρχικό αίτιο εκδήλωσης του φαινομένου του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Τα ΔΜΟ εμπλέκονται επιπλέον και σε ενζυματικές αντιδράσεις, στη μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων, στην μεταγωγή σήματος, στην ενεργοποίηση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, στη γονιδιακή έκφραση, και η αντιμικροβιακή δράση των ουδετερόφιλων και μακροφάγων έχουν θετικές δράσεις στους οργανισμούς και στα κύτταρα(αλλά σε μικρές ή μεσαίες συγκεντρώσεις) (Παπαγαλάνης, 2014).



Εικόνα 1: Παραγωγή ελεύθερων ριζών

### 1.1.3 Μιτοχονδριακή παραγωγή ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό είτε εξωγενώς είτε ενδογενώς. Ενδογενώς προκύπτουν ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε κατάσταση ηρεμίας, ένας ενήλικος άνθρωπος καταναλώνει περίπου 10 mmol οξυγόνου ανά λεπτό και εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Από αυτό το 95% χρησιμεύει για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια η οποία αποθηκεύεται υπό μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της "οξειδωτικής φωσφορυλίωσης".

Η διάσπαση των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών της τροφής, καταλήγει στη δημιουργία του ακετυλο-συνενζύμου Α το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος ή κύκλο του Krebs που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Σε συγκεκριμένες αντιδράσεις στον κύκλο του Krebs συγκεκριμένα κατά τη μετατροπή του μαλαϊκού οξέος σε οξαλοξικό) αφαιρούνται δύο ηλεκτρόνια από το πρώτο μόριο και μεταφέρονται στο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (nicotinamide adenine

dinucleotide, NAD)+ ανάγοντάς το σε NADH + H. Επιπλέον, κατά τη μετατροπή του σουκινικού σε φουμαρικό οξύ αφαιρούνται επίσης δύο ηλεκτρόνια και μεταφέρονται στο διουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης (FAD) ανάγοντάς το σε FADH<sub>2</sub>. Τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται στην "αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων" που αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων: το σύμπλεγμα της NADH διυδρογενάσης (complex 1), το σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c (complex 3) και το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c (complex 4) καθώς και δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ubiquinone και cytochrome c), τα οποία μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός σταθμός των μεταφερομένων ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται (προσθήκη ηλεκτρονίων) και παρουσία και πρωτονίων προς σχηματισμό νερού. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Εντούτοις, ιδίως από τα συμπλέγματα I και III, διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, singlet oxygen) και υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), τα οποία όμως εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: την υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει μαγνήσιο (MnSOD), η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το σύστημα θεωροδοξίνης-περοξυρεδοξίνης (thoredoxin-peroxyredoxin) 3 και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H<sub>2</sub>O. Ένα μικρό ποσοστό του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, όπως και το παραγόμενο σε άλλους ιστούς, διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς. Εντούτοις παρά την ικανότητα των μιτοχονδρίων να ανάγουν το μοριακό οξυγόνο πλήρως, τα οργανίδια αυτά αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή ελεύθερων ριζών του οργανισμού γιατί σε αυτά χρησιμοποιείται το 95-99% του οξυγόνου κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την μερική τάση του οξυγόνου αλλά αυξάνεται σημαντικά σε βλάβη των μιτοχονδρίων και ιδιαίτερα στην κατάσταση που περιέγραψαν για πρώτη φορά το 1979 οι Haworth και Handerl1 γνωστή ως "μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας" (mitochondrial transition permeability). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση της διαπερατότητας της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μόρια με MB < 1500 Da, που οδηγεί σε οξείδωση των μιτοχονδρίων. Στην ουσία πρόκειται για μεταβολή του συμπλέγματος πρωτεϊνών της έσω μεμβράνης γνωστού ως "μεταβολή της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων" (mitochondrial permeability transition pore). Το αποτέλεσμα

της διαταραχής αυτής είναι η μη-χρησιμοποίηση (uncoupling) της παραγόμενης ενέργειας, από την μεταφορά των ηλεκτρονίων, για την σύνθεση ATP και η μεγάλη παραγωγή

υπεροξειδίου, με συνέπεια την απόπτωση του κυττάρου. Η κατάσταση αυτή αποτελεί σταθερό εύρημα του συνδρόμου Raye, των εκφυλιστικών παθήσεων του νευρικού ιστού, αλλά και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων ενώ θεωρείται βασικός παθογενετικός μηχανισμός του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, και κυρίως  $H_2O_2$ , από τα μιτοχόνδρια αυξάνεται επίσης πολύ σε καταστάσεις σήψης.

#### **1.1.4 Κυτταροπλασματική παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου**

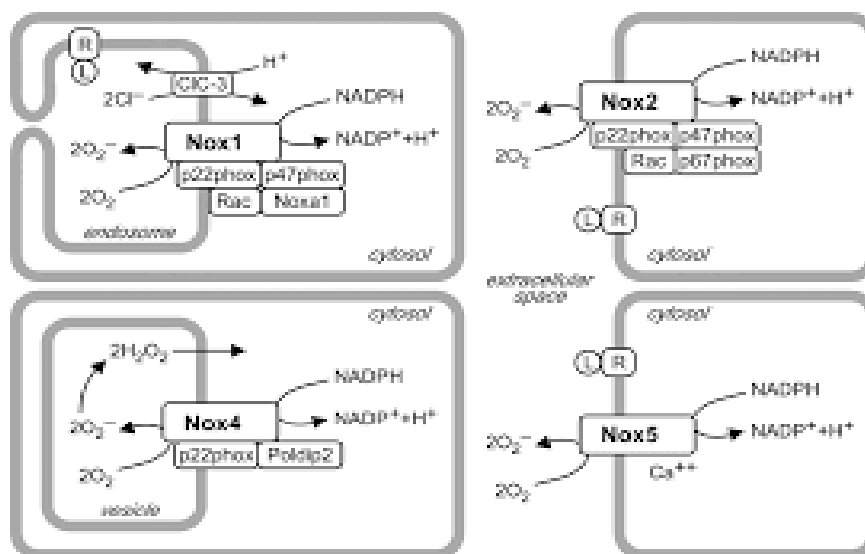
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν το 95% του οξυγόνου, και το υπόλοιπο 5% χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα για την παραγωγή υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και  $H_2O_2$  στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα συστήματα αυτά περιλαμβάνονται, η NADH-οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η ξανθινοξειδάση, και η λιποξυγενάση. Τα παραπάνω ένζυμα μετα φέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο ώστε να μην το ανάγουν πλήρως αλλά για τη μεταφορά κάθε ηλεκτρονίου σε κάθε στάδιο να παράγεται και ένα ενδιάμεσο προϊόν, δηλαδή  $O_2^-$  στο πρώτο στάδιο και  $H_2O_2$  στο δεύτερο.

Επειδή όμως τα πρώτα αυτά ενδιάμεσα προϊόντα είναι τοξικά για τους ιστούς, η συμβίωση του οργανισμού μαζί τους έχει διασφαλισθεί με την ανάπτυξη μηχανισμών εξουδετέρωσής τους αμέσως μετά από το σχηματισμό τους. Έτσι τα ένζυμα της οικογένειας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD) (Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, Cu,Zn-SOD στο κυτταρόπλασμα και EC-SOD στην κυτταρική μεμβράνη) μετατρέπουν το  $O_2^-$  σε  $H_2O_2$  στο οποίο στη συνέχεια δρουν αφενός η καταλάση και αφετέρου η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) και το μετατρέπουν σε νερό. Με τον τρόπο αυτό η άμεση βλαπτική δράση (οξείδωση παρακειμένων μακρομορίων) των παραπάνω ριζών περιορίζεται άμεσα. Μολονότι υπό φυσιολογικές συνθήκες τα δύο πρωτοσχηματιζόμενα προϊόντα της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (ιδίως το  $H_2O_2$ ) αποτελούν σηματοδοτικά μόρια και δευτερογενή διαβιβαστικά μόρια (second messenger) στην σηματοδοτική διαδικασία αυξητικών παραγόντων (growth factors) και ορμονών, υπό συγκεκριμένες

παθολογικές συνθήκες αποτελούν και υπόστρωμα για το σχηματισμό νέων ενδιάμεσων προϊόντων έναντι των οποίων ο οργανισμός διαθέτει περιορισμένη αμυντική ικανότητα. Μεταξύ των ριζών αυτών κυριότερες είναι: η υδροξυλική ρίζα (OH $\cdot$ ) η οποία παράγεται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, με την καταλυτική δράση του δισθενούς σιδήρου (ferrous state), που δίνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται σε τριθενή (ferric state) κατά την αντίδραση  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ , το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) που παράγεται με τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης και υπεροξυνιτρικό (ONOO $^-$ ) που παράγεται από το O<sub>2</sub> $^{\cdot -}$  παρουσία του μονοξειδίου του αζώτου.

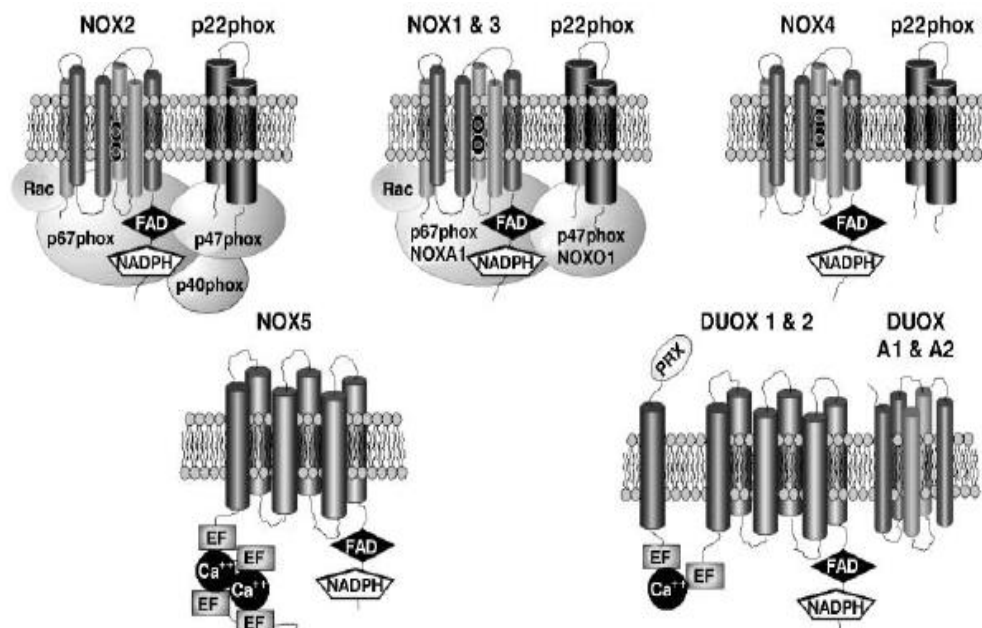
### 1.1.5 Ενζυμικά Συστήματα NOX και DUOX-οξειδασών

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν αποτελούν απλώς παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά ότι η παραγωγή τους γίνεται με λεπτομερώς προγραμματισμένο μηχανισμό από εξειδικευμένα ένζυμα, τις οξειδάσες NOX (NADPH-oxidase) και DUOX (dual-oxidase), εξυπηρετώντας την φυσική ανοσία, συγκεκριμένες σηματοδοτικές λειτουργίες και τη βιοσύνθεση ορμονών. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με φαγοκυτταρική λειτουργία (ουδετερόφιλα και μακροφάγα), όταν έρθουν σε επαφή με μικρόβια, αυξάνουν απότομα και σε πολύ μεγάλο βαθμό ("εκρηκτικά") την κατανάλωση οξυγόνου. Αυτό οφείλεται στην NADPH-οξειδάση η οποία παράγει μεγάλες ποσότητες O<sub>2</sub> $^{\cdot -}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και HOCl στο φαγόσωμα για την καταστροφή των μικροβίων. Οι οξειδάσες όμως δεν υπάρχουν μόνο στα φαγοκύτταρα αλλά σε σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού και συμμετέχουν τους στην παθογένεια πολλών νοσημάτων είτε λόγω ανεπάρκειάς τους είτε λόγω υπερδραστηριότητάς τους και υπερπαραγωγής ROS. Η ενεργοποίηση των συστημάτων των οξειδασών στα φαγοκύτταρα γίνεται ανάλογα με τις αμυντικές ανάγκες του οργανισμού (εφόσον δηλαδή υπάρχει ανάγκη φαγοκυττάρωσης). Στα υπόλοιπα κύτταρα η δράση τους είναι ιδιοστατική δηλαδή οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε πολύ βασικό επίπεδο. Η NOX έχει 5 ισομορφές τις NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4 και NOX-5 (εικ.1) ενώ η DUOX έχει δύο και συγκεκριμένα τις DUOX-1 και DUOX-2



**Εικόνα 2:** Ενζυμικά συστήματα NOX

Τα ηλεκτρόνια αποδίδονται στις οξειδάσες (σε όλες τις ισομορφές) από το κυτταροπλασματικό NADPH και μεταφέρονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της καταλυτικής μονάδας, η οποία αποτελείται από ένα μόριο FAD που είναι συνδεδεμένο στο καρβοξυλικό (κυτταροπλασματικό) άκρο της καταλυτικής μονάδας και δύο μόρια αίμης τα οποία είναι συνδεδεμένα μεταξύ των τμημάτων 3 και 5 του διαμεμβρανικού τμήματος της καταλυτικής μονάδας. Ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται σε O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Το υπεροξειδίο είναι το προϊόν των NOX1, NOX2 και NOX5 ενώ οι οξειδάσες NOX4, DUOX1 και DUOX2 παράγουν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το τελευταίο γεγονός παραμένει δυσερμήνευτο και έχει εκφρασθεί η άποψη ότι λόγω στερεοχημικής δομής των NOX4, DUOX1 και DUOX2 το παραγόμενο υπεροξειδίο καθυστερεί να απελευθερωθεί από το μόριο της οξειδάσης ώστε να συντίθεται και ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου πριν αποσπαστεί το πρώτο, και να δημιουργείται H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης



Εικόνα 3 : Δομές οξειδαδών NOX & DUOX

## 1.2 Οξειδωτικό στρες

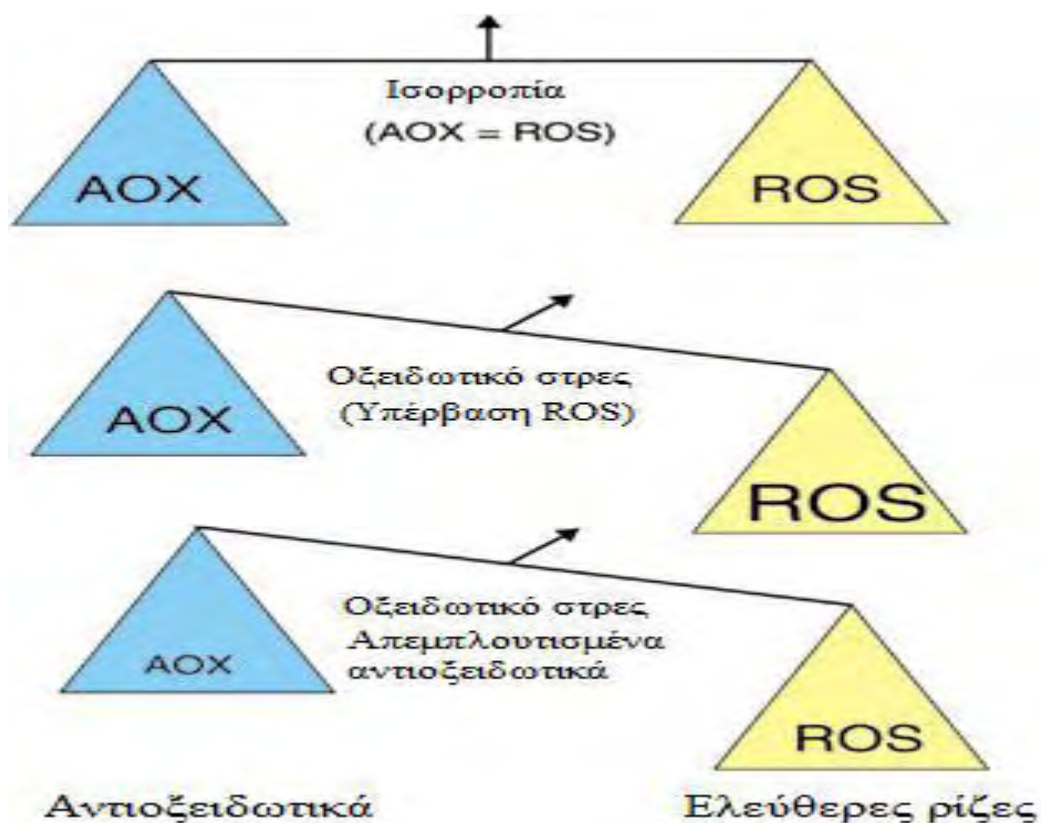
Οξειδωτικό στρες σε ένα κύτταρο ή οργανισμό ονομάζεται η παθολογική κατάσταση η οποία προκύπτει από τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων των οξειδωτικών παραγόντων( ΔΜΟ-ελεύθερες ρίζες) και των αντι-οξειδωτικών μηχανισμών.

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Γενικότερα, η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (Sies, 1999). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βλάβες και οι επιπτώσεις που προκαλούνται από τις ΔΜΟ εις βάρος του DNA και των λιπιδίων.

Οι βλάβες που αφορούν το DNA αποτελούν:



- DNA εγκοπές και DNA σπασίματα( στο πυρηνικό DNA στο mtDNA και στο DNA των χλωροπλαστών)
- Χημικές τροποποιήσεις στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης
- Σχηματισμός ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμός μεταξύ γειτονικών διπυριμιδινών (pyrimidine dimers) από ακτινοβολία UV (μεταξύ DNA και πρωτεϊνών).



**Εικόνα 4 :** Σχηματική απεικόνιση οξειδωτικού στρες.

Στα λιπίδια και συγκεκριμένα στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα και στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες έχουμε τις παρακάτω δράσεις :

- Υπεροξείδωση των λιπιδίων: σχηματισμός ριζών άνθρακα ( $R\cdot$ ), και παραγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων ( $ROOH$ )
- Αποικοδόμηση λιπιδικών υπεροξειδίων σε τοξικά προϊόντα

Τα αποτελέσματα των παραπάνω βλαβών στο DNA αποτελούν την μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και γενικότερα την κυτταρική δυσλειτουργία ενώ για τα λιπίδια επιφέρουν καταστροφές στην δομή και τη λειτουργία των μεμβράνων καθώς και γενικότερες διαταραχές στο κύτταρο

Για τις πρωτεΐνες οι χημικές μεταβολές που ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη. Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική αποδιάταξη της. Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σ' αυτό το στάδιο, τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία μακροπρόθεσμα σχηματίζουν ομοιοπολικές ενώσεις (cross links) μεταξύ τους και με τη συσσώρευσή τους, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο (Jung et al., 2007).

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι κυριότερες οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και οι συνέπειες στην λειτουργία τους :

Οξείδωση θειολικών ομάδων
Σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων
Σχηματισμός διτυροσινών, χλωρινίωση, νιτροσυλίωση, υδροξυλίωση
Τροποποιήσεις της τρυπτοφάνης
Υδρο(υπερό)ξυ παράγωγα αλειφατικών αμινοξέων
Σχηματισμός χλωραμινών, οξειδωτική απαμίνωση
Διαμετατροπές αμινοξέων (π.χ. His σε Asn, Pro σε OH-Pro)
Προσθήκη προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων (MDA, HNE)
Προσθήκη προϊόντων οξείδωσης (π.χ. p-hydroxyphenylacetaldehyde)
Αντιδράσεις γλυκίωσης και γλυκοξειδίωσης ( π.χ. Maillard browning)
Cross-links, συμπλοκοποίηση, διάσπαση πεπτιδικών δεσμών

1. Μείωση ή αύξηση ενζυμικής δραστηριότητας
2. Απώλεια λειτουργικότητας (π.χ. fibrinogen/fibrin clotting)
3. Απώλεια ενεργότητας αναστολέα πρωτεασών (π.χ. a-1-antitrypsin, a-2-macroglobulin)
4. Συμπλοκοποίηση (π.χ. IgG, LDL, a-synuclein, amyloid protein, prion protein)
5. Αυξημένη (π.χ. του πρωτεϊνικού μεταγραφικού ρυθμιστή IRP-2) ή μειωμένη ευαισθησία σε πρωτεόλυση
6. Μη φυσιολογική πρόσληψη ουσιών από τα κύτταρα (π.χ. LDL)
7. Τροποποιημένη μεταγραφή γονιδίων (π.χ. SoxR, IκB)
8. Αυξημένη ανοσογονικότητα (π.χ. ovalbumin, HNE- ή acrolein-LDL)

### 1.3 Αντιοξειδωτικά

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). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπών τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

#### 1.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

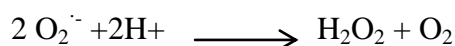
Ενζυμικά αντιοξειδωτικά αποτελούν :

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GSH-Px. Εκτός από αυτά τα κύρια ένζυμα, άλλα αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένων την οξυγενάση-1 της αίμης, και τις πρωτεΐνες οξειδοαναγωγής, όπως είναι οι θειορεδοξίνες (TRXs).

#### Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες σουπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$  :

SOD



Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (SOD1, SOD2, SOD3) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος σουπεροξειδίου (Culotta et al., 2006; Suzuki et al., 2000). Δύο από τις ισομορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Suzuki et al., 2000). Η SOD1 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η SOD2 χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η SOD3 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο

### **Καταλάση (CAT)**

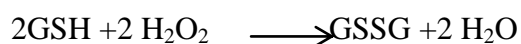
Η καταλάση (CAT) είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιδιαίτερα στα υπεροξειδισωμάτια, κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο με σκοπό να αποτοξικοποιήσουν τοξικές ουσίες και παράγουν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Antunes et al., 2002). Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:

καταλάση



### **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)**

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1-GPX5, Πίνακας 3) (Brigelius-Flohe, 2006; Drevet, 2006). Η GPX καταλύει την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή του οργανικού υδροϋπεροξειδίου (ROOH) σε νερό (H<sub>2</sub>O) και αλκοόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την GSH ή σε κάποιες περιπτώσεις την θειορεδοξίνη ή την γλουταρεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων (Bjornstedt et al., 1997; Callahan et al., 2001). Όταν η GSH είναι ο δότης ηλεκτρονίων, οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης

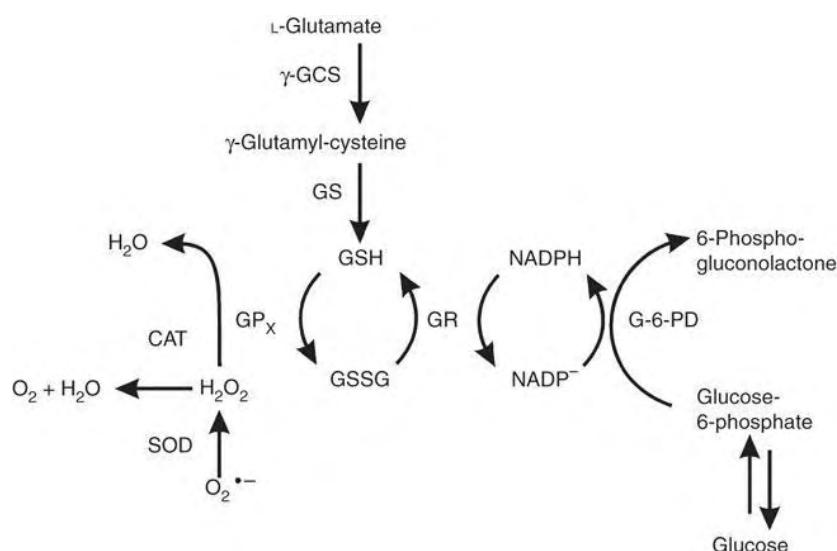


Αν και οι παραπάνω αντιδράσεις που καταλύονται από όλα τα είδη της GPx είναι οι ίδιες, η κάθε μορφή GPx διαφέρει ως προς την ειδικότητα του υποστρώματος και την κυτταρική θέση (Brigelius-Flohe, 1999). Η ποικιλία στην ειδικότητα των υποστρωμάτων και την κυτταρική θέση καθιστούν την GPx ως ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Το γεγονός ότι πολλά ισόενζυμα GPx ανάγουν μια μεγάλη ποικιλία υδροϋπεροξειδίων, κάνει την GPx ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων από βλάβες προερχόμενες από ROS

### Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



**Εικόνα 5 :** Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR)

### 1.3.2 Μη ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως βιταμίνες (βιταμίνες C και E), β-καροτένιο, ουρικό οξύ, και την GSH.

#### Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

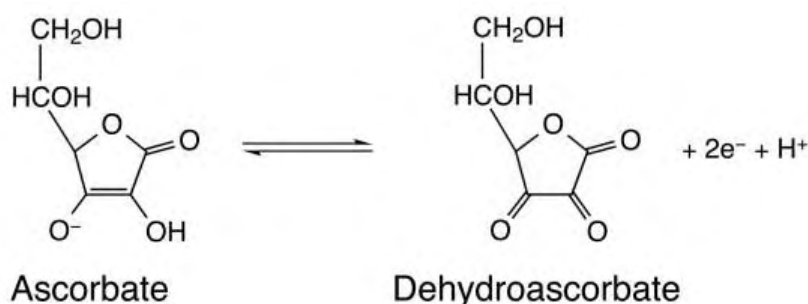
Η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) παρέχει ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική υδατικής φάσεως αντιοξειδωτική ικανότητα. Όλες οι γνωστές φυσιολογικές και βιοχημικές δράσεις της βιταμίνη C οφείλονται στη δράση της ως δότης ηλεκτρονίων. Λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό καθώς προσδίδοντας ηλεκτρόνια σε άλλα μόρια τα εμποδίζει να οξειδωθούν. Η βιταμίνη C μπορεί να οξειδωθεί από πολλά είδη που έχουν τη δυνατότητα να συμμετέχουν σε ανθρώπινες ασθένειες. Αυτά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες που έχουν είδη αναφερθεί παραπάνω:

- 1)Ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια (ρίζες)
- 2) Οι ενώσεις που είναι δραστικές, αλλά δεν είναι ρίζεςό πως το υποχλωριώδες οξύ, και οι νιτροζαμίνες
- 3)Ενώσεις που παραγονταί άπο τις κατηγορίες 1,2 έπειτα από αντίδραση με την βιταμίνη C

Ένα παράδειγμα αποτελεί η ο σχηματισμός της τοκοφερόξιλικής ρίζας που σχηματίζεται όταν εξωγενείς οξειδωτικοί αντιδρούν με την α-τοκοφερόλη στην χαμηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεΐνης ( LDL). Η τοκοφεροξιλική ρίζα μπορεί να επανέλθει στην μορφή της α τοκοφέρολης με τη δράση του ασκορβικού.

- 4) Σε αντιδράσεις με μεσολάβηση μετάλλου που περιλαμβάνουν σίδηρο και χαλκό

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι όταν το ασκορβικό οξύ δίνει ηλεκτρόνια , αυτά χάνονται διαδοχικά. Τα είδη που σχηματίζονται μετά την απώλεια ενός ηλεκτρονίων αποτελούν ελεύθερες ρίζες, αλλά είναι σταθερότερες και χημικά αδρανείς σε σχέση με τις άλλες ελεύθερες ρίζες .



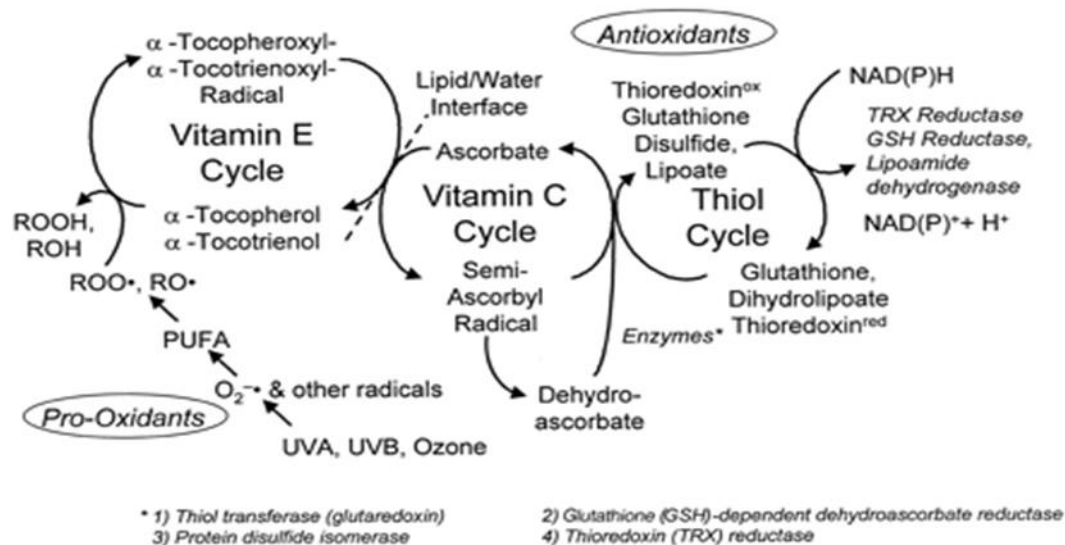
**Εικόνα 6: Σχηματισμός του ασκορβικού στην οξειδωμένη της μορφή**

Οι άνθρωποι μπορούν να αποκτήσουν ασκορβικό μόνο εξωγενώς μέσω της τροφής. Η βιταμίνη C βρίσκεται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά και παρουσιάζονται ενδεικτικά τροφές πλούσιες σε ασκορβικό οξύ.

Source (Portion Size)	Vitamin C, mg
<b>Fruit</b>	
Cantaloupe (1/4 Medium)	60
Fresh grapefruit (1/2 fruit)	40
Honeydew Melon (1/8 Medium)	40
Kiwi (1 Medium)	75
Mango (1 Cup, sliced)	45
Orange (1 Medium)	70
Papaya (1 Cup, cubes)	85
Strawberries (1 Cup, sliced)	95
Tangerines or tangelos (1 Medium)	25
Watermelon (1 Cup)	15
<b>Juice</b>	
Grapefruit (1/2 Cup)	35
Orange (1/2 Cup)	50
Fortified Juice	
Apple (1/2 Cup)	50
Cranberry juice cocktail (1/2 Cup)	45
Grape (1/2 Cup)	120
<b>Vegetables</b>	
Asparagus, cooked (1/2 Cup)	10
Broccoli, cooked (1/2 Cup)	60
Brussels sprouts, cooked (1/2 Cup)	50
Cabbage	
Red, raw, chopped (1/2 Cup)	20
Red, cooked (1/2 Cup)	25
Raw, chopped (1/2 Cup)	10
Cooked (1/2 Cup)	15
Cauliflower, raw or cooked (1/2 Cup)	25
Kale, cooked (1 cup)	55
Mustard greens, cooked (1 cup)	35
Pepper, red or green	
Raw (1/2 Cup)	65
Cooked (1/2 Cup)	50
Plantains, sliced, cooked (1 Cup)	15
Potato, baked (1 Medium)	25
Snow peas	
Fresh, cooked (1/2 Cup)	40
Frozen, cooked (1/2 Cup)	20
Sweet potato	
Baked (1 Medium)	30
Vacuum Can (1 Cup)	50
Canned, syrup-pack (1 Cup)	20
Tomato	
Raw (1/2 Cup)	15
Canned (1/2 Cup)	35
Juice (6 fluid oz)	35

## Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)

Η λιποδιαλυτή βιταμίνη Ε είναι συγκεντρωμένη στο υδροφοβικό εσωτερικό χώρο της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελεί τη κύρια άμυνα κατά των τραυματισμών στην μεμβράνη που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες. Η βιταμίνη Ε δίνει ηλεκτρόνια στις ρίζες υπεροξυλίου, η οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η α- τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή μορφή της βιταμίνης Ε και το κύριο αντιοξειδωτικό δεσμευμένο σε μεμβράνη στα κύτταρα. Η βιταμίνη Ε προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη Ε λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη Ε, δεν δρα απομονωμένη από τα άλλα αντιοξειδωτικά αλλά αποτελεί μέρος ενός συνόλου οξειδοαναγωγικών κύκλων, αντιοξειδωτικών που ονομάζεται ‘αντιοξειδωτικό δίκτυο’ (Εικόνα 2).



**Εικόνα 7 :** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βιταμίνης C, της βιταμίνης Ε και των οξειδοαναγωγικών κύκλων θειόλης (Packer, 2001).

## Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η γλουταθειόνη συντίθεται



σε κυτταρικό επίπεδο στο κυτταρόπλασμα από αμινοξέα σε δύο διαδοχικά βήματα, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθετάση της γλουταθειόνης. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Απαντά είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της. Η γλουταθειόνη GSH είναι ιδιαίτερα άφθονη σε όλα τα διαμερίσματα κυττάρων και είναι το μεγαλύτερο διαλυτό αντιοξειδωτικό. Η αναλογία GSH / GSSG είναι ένας σημαντικό μέτρο του οξειδωτικού στρες. Η GSH εμφανίζει αντιοξειδωτικές επιδράσεις με διάφορους τρόπους. Αποτξοικοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα υπεροξείδια των λιπιδίων, μέσω της δράσης της GSH-Px. Η GSH δωρίζει ηλεκτρόνια στο  $H_2O_2$  για τη εξουδετέρωσή του σε  $H_2O$  και  $O_2$ . Η GSSG μετατρέπεται πάλι σε GSH με την αναγωγή της GSH που χρησιμοποιεί NAD(P)H ως ο δότης ηλεκτρονίων. Η GSH-PXS είναι επίσης σημαντική για την προστασία της κυτταρικής μεμβράνης από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η γλουταθειόνη προσδίδει πρωτόνια στα μεμβρανικά λιπίδια και τα προστατεύει από το οξειδοτικό στρες. Η GSH είναι συμπαραγοντας για διάφορα ένζυμα αποτοξίνωση, όπως GSH-Px και μεταφοράς. Έχει ένα ρόλο στην μετατροπή βιταμίνη C και E πίσω στην δραστική μορφή τους. Η GSH προστατεύει κύτταρα από την απόπτωση μέσω της αλληλεπίδρασης της με προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μονοπάτια σηματοδότησης. Ρυθμίζει επίσης και ενεργοποιεί διάφορους παράγοντες μεταγραφής, όπως AP-1, NF-κΒ, και Sp-1.

### **Καροτενοειδή (β-καροτένιο)**

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στα φυτά. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Το β-καροτένιο είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πρωτίστως, το β-καροτένιο έχει βρεθεί ότι αντιδρά με τις ρίζες του υπεροξυλίου ( $ROO\cdot$ ), υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ), και υπεροξειδίου

(O<sub>2</sub><sup>2-</sup>). Τα ακαροτενοειδή έχουν δείξει την αντιοξειδωτική δράση τους σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου μερικής πίεσης, αλλά μπορεί να έχει επιπτώσεις προ-οξειδωτικά σε υψηλότερες οξυγόνου συγκεντρώσεις.<sup>97</sup>

Τα καροτενοειδή και το ρετινοϊκό οξύ είναι σε θέση να ρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες. Το β-καροτένιο αναστέλλει την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες ενεργοποίηση του NF-kB και την παραγωγή της ιντερλευκίνης (IL) -6 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α). Το ρετινοϊκό οξύ έχει αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις στα κύτταρα. Αυτή η ιδιότητα διαμεσολαβείται κυρίως από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος που ποικίλουν ανάμεσα στα είδη κυττάρων. Σε κύτταρα μαστικού καρκινώματος, υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος δείχθηκε να προκαλέσει την αναστολή της ανάπτυξης με διέγερση του κυτταρικού κύκλου της απόπτωσης.

### **Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό. *In vitro* μελέτες έχουν τονίσει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλουν προ-οξειδωτικά ένζυμα ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με προ-οξειδωτικά ιόντα όπως Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ή Cu<sup>2+</sup>. Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης άμεση δράση παγίδευσης κάποιων ROS με άμεση δωρεά ατόμου υδρογόνου.

### **Συνένζυμο Q10**

Το συνένζυμο Q10 (CoQ10) είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002; Maulic et al., 2000). Το CoQ10 είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Witt et al., 1992; Crane, 2001). Το CoQ10 έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

## Πρωτεΐνες

Η πρωτεΐνη αντιπροσωπεύει περίπου το 15% του σωματικού βάρους ενός ατόμου και εκτός από το νερό, είναι το μεγαλύτερο συστατικό στο ανθρώπινο σώμα. Επιτελεί τις ίδιες λειτουργίες τόσο σε άτομα με καθιστική ζωή όσο και σε φυσικά δραστήρια άτομα. Ωστόσο, οι διατροφικές πρωτεϊνικές απαιτήσεις των αθλητών είναι μεγαλύτερες από αυτές των ατόμων με καθιστική ζωή λόγω των αλλαγών στο μεταβολισμό των αμινοξέων που επάγονται μετά από άσκηση. Μια μικρή ποσότητα πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ως καύσιμο κατά την άσκηση. Επιπλέον πρωτεΐνη χρειάζεται για την επιδιόρθωση βλαβών στις μυϊκές ίνες και για την αναδιαμόρφωση του μυϊκού ιστού μετά από έντονη άσκηση.

Η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών οφείλεται σε σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ικανοτήτων τους να απενεργοποιούν δραστικά είδη οξυγόνου και ελεύθερες ρίζες, να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με προοξειδωτικά μέταλλα μετάπτωσης, να ανάγουν υδροϋπεροξειδία και να εξαλείφουν ενζυμικά συγκεκριμένα οξειδωτικά.

Τα αμινοξέα οικοδομούν σύμπλοκα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ορισμένα αμινοξέα (π.χ., αργινίνη, κιτρουλίνη, γλυκίνη, ταυρίνη, και ιστιδίνη), κάποια μικρά πεπτίδια (π.χ., GSH και καρνοσίνη), και αζωτούχοι μεταβολίτες (π.χ., κρεατίνη και ουρικό οξύ) ανιχνεύουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Επιπλέον, τα διαθέσιμα στοιχεία έχουν δείξει ότι η ταυρίνη αναστέλλει την έκφραση iNOS και τη σύνθεση NO σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων, των μακροφάγων, και των νευρογλοιακών κυττάρων. Έτσι, μία διαιτητική ανεπάρκεια πρωτεΐνης όχι μόνο μειώνει τη σύνθεση των αντιοξειδωτικών ενζύμων αλλά επίσης μειώνει τις συγκεντρώσεις ιστών σε αντιοξειδωτικά, με τον τρόπο αυτό με αποτέλεσμα να φέρνουν σε κίνδυνο την οξειδοτική ισοροποία. Ο ακριβής μηχανισμός που οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση των πεπτιδίων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, αλλά διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι είναι αναστολείς της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων [WuCH, ChenHM, Shiao CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel], και απενεργοποιούν ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα αντιοξειδωτικά

πεπτίδια διατηρούν τα κύτταρα ασφαλή από τη δράση των ROS μέσω της επαγωγής γονιδίων. Όπως έχει βρεθεί ότι διπεπτίδιο Met-Tyr από τους μύες της σαρδέλας αποτρέπει το οξειδωτικό στρες διεγείροντας την έκφραση της αίμης οξυγενάσης-1 (HO-1) και της φερριτίνης (πρωτεΐνες αντιοξειδωτικής άμυνας) σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από μια μελέτη αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη φύλλων είναι σε θέση να ενισχύει τις δραστηριότητες της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH-Px) και της υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) .

Όλα τα 20 αμινοξέα που βρίσκονται σε πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, αν η ενέργεια της ρίζας που προσβάλλεται είναι υψηλή (π.χ. ρίζα υδροξυλίου). Είναι κατανοητό ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρωτεΐνης εν μέρει αποδίδεται στην χαμηλότερη δραστηριότητα των πρωτεϊνικών ριζών αν αυτές οι ρίζες μεταφερθούν στο εσωτερικό της πρωτεΐνης όπου είναι ανίκανες να αλληλοεπιδράσουν με λιπίδια. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πρωτεϊνών σε αντιδράσεις οξείδωσης μέσω μεσολάβησης ελευθέρων ριζών μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να δρουν ως συσκευές παγίδευσης ριζών (Neuzil et al., 1993; Ostdal et al., 2002).

### **Αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων**

Ένας άλλος αντιοξειδωτικός μηχανισμός των πρωτεϊνών προκύπτει από την ικανότητα τους να ανάγουν τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία σε μη δραστικά λιπιδικά υδροξείδια από μη ριζικές αντιδράσεις . Τα κατάλοιπα μεθειονίνης πιστεύεται ότι παίζουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η HDL των σκύλων, η οποία παρουσιάζει έλλειψη των καταλοίπων μεθειονίνης Met112 και Met148, εμφανίζει ασθενέστερη αναγωγική δραστηριότητα από την ανθρώπινη HDL . Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων σε λιπιδικά υδροξείδια περιλαμβάνει την άμεση μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το σουλφίδιο της ομάδας θειοαιθέρα της μεθειονίνης οδηγώντας στην οξείδωση της μεθειονίνης σε σουλφοξείδιο μεθειονίνης (Garner et al., 1998a; Garner et al., 1998b; Panzenbock & Stocker, 2005).

## 1.5 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein)

Το τυρόγαλα αποτελεί το υγρό που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια παραγωγής τυριού με πήξη και συγκεκριμένα κατά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών καζεΐνης (που βρίσκονται σε στερεή μορφή) από το γάλα. Το τυρόγαλο, είναι ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος που για σειρά ετών θεωρείτο ως απόβλητο και πρόβλημα για το περιβάλλον. Στην πραγματικότητα, όμως, πρόκειται για μία πολύ χρήσιμη πρώτη ύλη για παραγωγή σειράς προϊόντων διατροφής λόγω των ιδιοτήτων των συστατικών του.

S.No	Constituent	Unit	Sweet whey	Acid whey
1	Water	%	93-94	94-95
2	Dry matter	%	6-6.5	5-6
3	Lactose	%	4.5-5	3.8-4.3
4	Lactic acid	%	traces	up to 0.8
5	Total protein	%	0.8-1.0	0.8-1.0
6	Whey protein	%	0.6-0.65	0.6-0.65
7	Citric acid	%	0.1	0.1
8	Minerals	%	0.5-0.7	0.5-0.7
9	pH		6.4-6.2	5.0-4.6
10	SH Value		about 4	20-25

Εικόνα 8 : Σύνθεση Πρωτεΐνης τυρογάλακτος



Εικόνα 9: παραγωγή πρωτεΐνης ορού γάλακτος ως παραπροϊόν της παραγωγής τυριού

### 1.5.1 Παραγωγή πρωτεΐνης τυρογάλακτος

#### A) Ξήρανση

Η ξήρανση πρωτεΐνης τυρογάλακτος είναι η πιο απλή διαδικασία που χρησιμοποιείται στη παραγωγή σκόνη πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Στοχεύει και χρησιμοποιείται μόνο για να μειώσει το ποσοστό της υγρασίας. Τυπικές διεργασίες ξήρανσης τυρογάλακτος αποτελεί η εξάτμιση σε πολλαπλά στάδια σε εξατμιστήρες κενού, που ακολουθείται από ξήρανση με ψεκασμό ή ξήρανση κυλίνδρου. Το τυρόγαλα πρώτον συμπυκνώνεται σε ολικά στερεά 40-70% του συνολικού βάρους και στη συνέχεια με τη χρήση πιστολιού ψεκασμού ή ρολό στεγνωτήρα αφαιρείται μέχρι το τελικό προϊόν να φθάσει το 5% περιεκτικότητας σε υγρασία. Αν και ακούγεται σαν μια απλή επεξεργασία μπορεί να πάρει αρκετά περίπλοκη, εν μέρει λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη. Απαραίτητα στάδια είναι η προ-κρυστάλλωση της λακτόζης πριν από την ξήρανση

#### B) Μέθοδοι παραγωγής που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ορού γάλακτος

Η βασική ιδέα πίσω από την κατασκευή συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών ορού γάλακτος, είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα υπόλοιπα συστατικού του τυρογάλακτος σε ένα πρώτο στάδιο και στη συνέχεια το περαιτέρω συμπύκνωση της λακτόζης που παραμένει με εξάτμιση και ξήρανση με ψεκασμό.

Υπάρχουν αρκετές διαδικασίες για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών τυρογάλακτος, οι οποίες μπορεί να διαιρεθούν στις κατηγορίες που ακολουθούν :

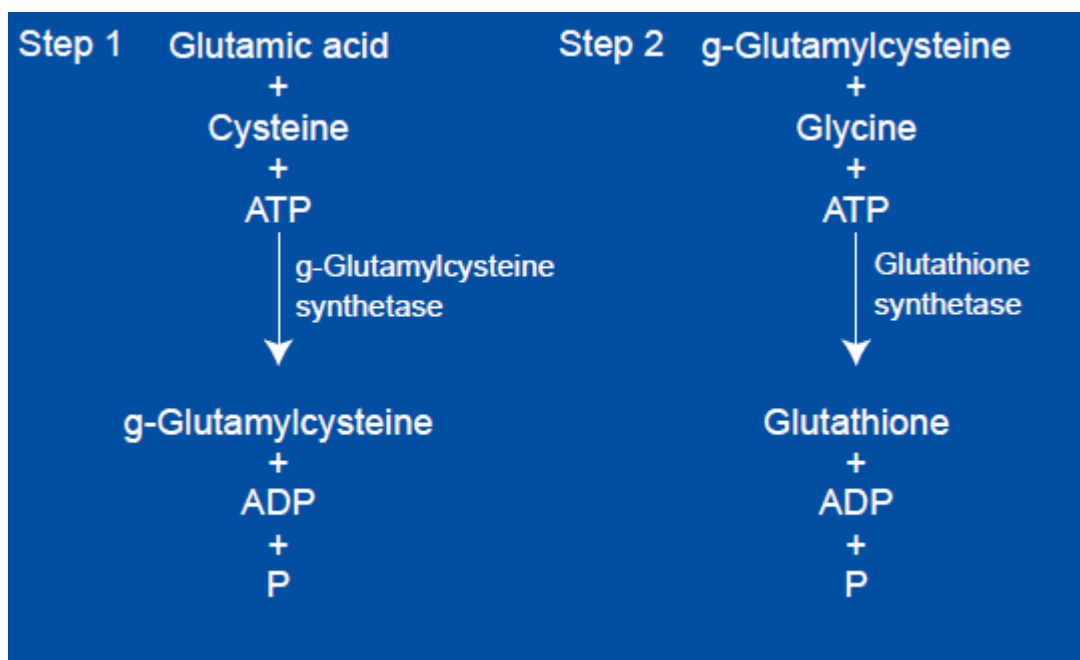
- Κατακρύμνιση μέσω θερμότητας
- Διεργασίες απομόνωσης μέσω μεμβρανών (Μεμβρανικά συστήματα χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλη τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων για τον έλεγχο περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, λίπος και λακτόζη.
- Χρωματογραφικός κλασματικός διαχωρισμός

## 1.5.2 Χημική σύσταση και αντιοξειδωτική ικανότητα της whey πρωτεΐνης

### 1) Αμινοξικό περιεχόμενο

Οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με διάφορες πηγές φυτικών πρωτεϊνών όπως η σόγια, το καλαμπόκι, το σιτάρι. Τα αμινοξέα αυτά απορροφούνται ευκολότερα από τον οργανισμό σε σχέση με την ελεύθερη μορφή τους. Σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεϊνών, η whey έχει μια υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) - λευκίνη, ισολευκίνη, και βαλίνη. Τα BCAAs, ιδιαίτερα η λευκίνη, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών.

Οι πρωτεΐνες ορρού γάλακτος είναι επίσης πλούσια στα θειούχα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Η υψηλή συγκέντρωση αυτών των αμινοξέων, ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της ενδοκυτταρικής τους μετατροπής (κυστεΐνη) σε γλουταθειόνη (Εικόνα 6).



Εικόνα 10 : Παραγωγή γλουταθειόνης από κυστεΐνη

## **2)Λακτοφερρίνη**

Η λακτοφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύει τον σίδηρο, και αποτελεί ένα μη-ενζυματικό αντιοξειδωτικό. Η λακτοφερρίνη της whey πρωτεΐνης αποτελείται από μία απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα με δύο θέσεις πρόσδεσης για τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου.

## **3)Ανοσφαιρίνες**

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος περιέχει μια σημαντική ποσότητα ανοσοσφαιρινών, περίπου 10-15 % τις συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Η β-γαλακτοσφαιρίνη αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ της συνολικής πρωτεΐνης ορού γάλακτος των βοοειδών, ενώ το ανθρώπινο γάλα δεν περιέχει βήτα-λακτοσφαιρίνη. Πέραν του ότι είναι μια πηγή των βασικών και διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέων, έχει εντοπιστεί μια πρωτεΐνη δέσμησης ρετινόλης εντός της δομής βήτα-λακτοσφαιρίνης.

Η άλφα-λακταλβουμίνη είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο ανθρώπινο και βόειο γάλα. Περιλαμβάνει περίπου 20-25 τοις εκατό των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από αμινοξέα, και αποτελεί μία εύκολα διαθέσιμη πηγή βασικών αμινοξέων και αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Μελέτες έδειξαν ότι η άλφα-λακταλβουμίνη έχει άμεση επίδραση στη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων, καθώς και την καταστολή των Τ εξαρτώμενων και ανεξάρτητων ανοσοαπαντήσεων.

## **4) Αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης τυρογάλου**

Η πρωτεΐνη τυρογάλου έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, πιθανόν με τη συμβολή των πλούσιων σε κυστεΐνη πρωτεϊνών ότι η ενίσχυση στη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH), που αποτελεί έναν ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό παράγοντα. Η GSH αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμινικό, και κυστεΐνη. Η κυστεΐνη περιέχει μια ομάδαθειόλης (σουλφυδρυλίου) που χρησιμεύει ως ένα δραστικό αναγωγικό παράγοντα στην πρόληψη της οξείδωσης και βλάβης των ιστών. Επιπλέον τα πεπτίδια που περιέχονται αναγνωρίζουν και απενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά



## 1.6 Πληροφορίες Για Τους Χοίρους

Ο οικόσιτος χοίρος (κοινώς γουρούνι) είναι οικόσιτο θηλαστικό ζώο που ανήκει στο γένος συς, στην οικογένεια σνίδες και στην τάξη αρτιοδάκτυλα. Είναι ζώο παμφάγο και πολύ γόνιμο. Απαντάται σε όλα τα μέρη της γης και εκτρέφεται κυρίως για το κρέας του. Παρά τις διαφορές τους, όλες οι φυλές γουρουνιών χαρακτηρίζονται γενικά από χοντροκομμένο και μονοκόμματο σώμα, κοντά πόδια και κωνικό κεφάλι, το οποίο καταλήγει σε κοντό ρύγχος. Το γεγονός ότι υπάρχουν πολλές φυλές χοίρων υποδεικνύει ότι η εξημέρωση έγινε ανεξάρτητα σε διάφορες περιοχές του κόσμου και ότι δεν ξεκίνησε από το ίδιο είδος αγριόχοιρου. Γεννά συνήθως δύο φορές το χρόνο, από 5-20 μικρά κάθε φορά. Το πεπτικό του σύστημα μπορεί να επεξεργαστεί κάθε είδους τροφή, ακόμα και τα υπολείμματα του φαγητού που τρών οι άνθρωποι. Αυτό συνιστά μεγάλο πλεονέκτημα για τους εκτροφείς χοίρων, όπως και η μέγιστη απόδοσή του σε κρέας και λίπος. Η απόδοση αυτή φτάνει άνετα το 70% του βάρους του σώματός του στις κοινές φυλές και ξεπερνά το 85% στις βελτιωμένες.



**Εικόνα 11 :** Χοίροι

### 1.6.1 Εκτροφή χοίρων

Η παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων (χοίρων,) καθορίζεται από το γενότυπό τους και επηρεάζεται από την κατάσταση της υγείας τους και το περιβάλλον εκτροφής τους. Με τον όρο περιβάλλον εκτροφής υπονοούμε τις συνθήκες ενσταβλισμού, τη μεταχείριση των ζώων, καθώς και τη διατροφή τους. Η διατροφή αποτελεί βασικό στοιχείο της εκτροφής όλων των παραγωγικών ζώων αφού επηρεάζει άμεσα τις αποδόσεις και την υγεία τους. Επιπλέον, το απαιτούμενο κόστος για τη διατροφή των εκτρεφόμενων ζώων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την οικονομικότητα της εκτροφής.

Στόχος της διατροφής είναι να εφοδιάσει το ζώο με όλα εκείνα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που εξασφαλίζουν την υγεία και τη παραγωγικότητα του ζώου καθώς επίσης και να βελτιώσει τη ποιότητα των προϊόντων που παράγει το ζώο, δηλαδή το γάλα και το κρέας. Η παραγωγή καλής ποιότητας και χαμηλού κόστους κρέατος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ορθολογική και ισόρροπη διατροφή. Η χορήγηση ενός επαρκούς ποσοτικά και ισορροπημένου ποιοτικά σιτηρεσίου έχει ιδιαίτερη σημασία, αφού η διατροφή συμμετέχει σε ποσοστό 65% στη διαμόρφωση του τελικού κόστους παραγωγής. Μη ισόρροπη διατροφή έχει ποικίλες δυσμενείς επιδράσεις με συνέπεια στη μείωση της οικονομικής απόδοσης της εκμετάλλευσης. Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί μικρός ρυθμός αύξησης βάρους, μειωμένη εκμετάλλευση της τροφής. Η διατροφή των παραγωγικών ζώων διαφέρει ανάλογα με την ηλικία του ζώου, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται και το σκοπό της εκτροφής.

Εκτός από τη διατροφή, σημαντικό ρόλο στην ευζωία και στην ανάπτυξη των παραγωγικών ζώων παίζει και το περιβάλλον εκτροφής, δηλαδή οι συνθήκες ενσταβλισμού καθώς και η μεταχείριση των ζώων.

Οι συνθήκες ενσταβλισμού πρέπει να διέπονται από κανόνες που εξασφαλίζουν την καλή διαβίωση των ζώων έτσι ώστε τα ζώα να μην υφίσταται κανένα περιττό πόνο, ταλαιπωρία ή τραυματισμό και επίσης να εξασφαλίζουν συνθήκες εκτροφής που να ικανοποιούν τις φυσιολογικές και ηθολογικές ανάγκες των ζώων (π.χ ανάγκες συμπεριφοράς όσον αφορά κατάλληλη ελευθερία κινήσεων και άνεση).

Συγκεκριμένα στις σταυλικές εγκαταστάσεις που εκτρέφονται παραγωγικά ζώα η κυκλοφορία του αέρα, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις αερίων πρέπει να τηρούνται μέσα σε όρια που δεν είναι επιβλαβή για τα ζώα. Επίσης οι χώροι να καθαρίζονται σχολαστικά, απομακρύνοντας τα κόπρανα, τα ούρα και τα υπολείμματα τροφής, όσον το δυνατόν ταχύτερα.

Κατά διαστήματα πρέπει να παρέχεται σε όλα τα ζώα, σιτηρέσιο κατάλληλο και προσαρμοσμένο στην ηλικία, το βάρος, τη συμπεριφορά και τις φυσιολογικές τους ανάγκες και να έχουν συνεχή πρόσβαση σε πόσιμο νερό.

Επίσης οι εκτροφείς πρέπει να προσφέρουν στα ζώα την καλύτερη δυνατή φροντίδα κατά τη διάρκεια της εκτροφής, αλλά και κατά τη μεταφορά τους στα σφαγεία.

Η εκτροφή των χοιριδίων που συμμετείχαν στο πειραματικό μέρος αυτού του έργου πραγματοποιήθηκε σε εγκαταστάσεις οι οποίες πληρούσαν όλους τους απαραίτητους κανόνες, οι οποίοι εξασφάλιζαν την άριστη διαβίωση των συγκεκριμένων ζώων. Κατά τη διάρκεια των πειραματισμών παρακολούθηθηκε η ανάπτυξή τους και συγκεκριμένα καταγράφηκε η ημερήσια αύξηση βάρους καθώς και η ημερήσια κατανάλωση τροφής

## 2. Σκοπός

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία, ασχοληθήκαμε με την αξιοποίηση του τυρόγαλου που αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας γάλακτος που για σειρά ετών θεωρείτο ως απόβλητο και πρόβλημα για το περιβάλλον. Όμως υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησης του για την κατασκευή βιολειτουργικών τροφίμων λόγω των ευεργετικών του επιδράσεων στην υγεία και των συστατικών του. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πρωτεϊνών του τυρόγαλου έχει διαπιστωθεί στη βιβλιογραφία και για το λόγο αυτό επιχειρήσαμε τη χρησιμοποίηση του για την παραγωγή βιολειτουργικών ζωοτροφών εμπλουτισμένες με πρωτεΐνες τυρογάλακτος και τις χορηγήσαμε μέσω της διατροφής σε νεαρά χοιρίδια. Ο τελικός στόχος του πειράματος μας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης των συγκεκριμένων ζωοτροφών στην οξειδοαναγωγή κατάσταση στους ιστούς (τετρακέφαλος, καρδιά), στο πλάσμα και σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των χοιριδίων μέσω δεικτών της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Γενικά

Η εκτροφή των χοιριδίων πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις εκτροφής χοίρων, του ΤΕΙ Θεσσαλίας στη Λάρισα. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες 2010/63/ΕΕ του Ε. Κ. και του Συμβουλίου της 22/10/2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.



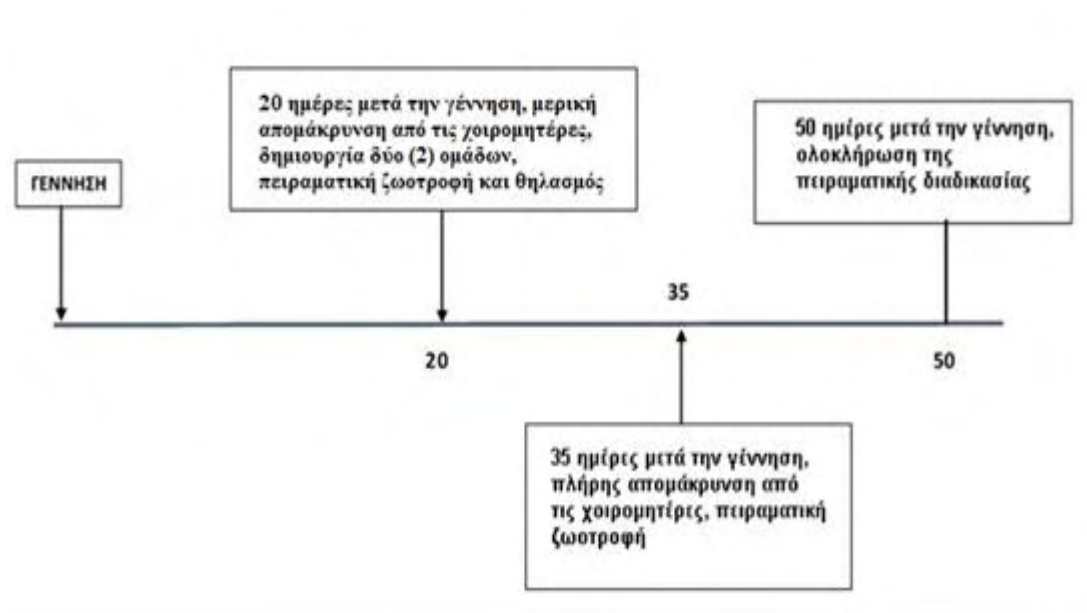
**Εικόνα 12 :** Θάλαμος απογαλακτισμού-εκτροφής χοιριδίων

Κατά τον μήνα Φεβρουάριο γεννήθηκαν είκοσι-οκτώ (28) χοιρίδια από δύο (2) χοιρομητέρες. Το γενετικό υπόβαθρο των νεαρών χοιριδίων προήλθε από τη διασταύρωση Landrace (μητέρα) X Large White – Duroc – Pietrain (πατέρας)



**Εικόνα 13 :** κελιά εκτροφής χοιριδίων

Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία :



Στην ηλικία των 20 ημερών τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες (10 από τη μία χοιρομητέρα και 10 από την άλλη). Στην ομάδα Α (ομάδα ελέγχου) χορηγήθηκε σύνηθες πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) ανάπτυξης χοιριδίων. Στην ομάδα Β χορηγήθηκε ΜΣΖ ανάπτυξης, στο οποίο ενσωματώθηκε το ενσίρωμα αραβοσίτου και πρωτεϊνών τυρόγαλου.

Τη πρώτη εβδομάδα της πειραματικής διεργασίας, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους σε διαφορετικά κελιά για χρονικό διάστημα οκτώ ωρών, τη δεύτερη εβδομάδα του πειραματισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα ώρες, ώστε να τρέφονται και με το σιτηρέσιο ταυτοχρόνως με το μητρικό γάλα. Η ολική απομάκρυνση των χοιρομητέρων, δηλαδή ο απογαλακτισμός των χοιριδίων, έλαβε χώρα 35 μέρες μετά την γέννηση τους, οπότε και τα νεαρά χοιρίδια μεταφέρθηκαν ανά ομάδα σε ξεχωριστό κελί και καταναλώνανε όλη τη μέρα το αποκλειστικά σιτηρέσιο που τους χορηγούνταν. Πραγματοποιήθηκε επιπλέον, παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης τροφής από τα χοιρίδια στα σιτηρέσια.

### **3.1.1 Παραγωγικά Χαρακτηριστικά**

#### **1) Ημερήσια κατανάλωση τροφής**

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας εκτός από την καθημερινή χορήγηση των πειραματικών σιτηρεσίων, γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια.

#### **2) Εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων**

Εκτός από την ημερήσια μέτρηση της κατανάλωσης σιτηρεσίου, γινόταν και μετρήσεις στα βάρη των χοίρων.

#### **3) Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους χοιριδίων (ADG)**

## **3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου**

### **3.2.1 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών**

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διατροφή σήμερα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη ζωική παραγωγή καθώς δεν επηρεάζει μόνο την υγεία και την παραγωγικότητα των αγροτικών ζώων, αλλά και το κόστος παραγωγής των παραγόμενων κτηνοτροφικών προϊόντων.

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

Η ορθή επιλογή και κατάρτιση των ζωοτροφών απαιτεί την ακριβή γνώση της θρεπτικής τους αξίας, ώστε να καλύπτουν επαρκώς τις διατροφικές ανάγκες των ζώων, συμπεριλαμβανομένου παράλληλα το κόστος παραγωγής. Αυτό ουσιαστικά προϋποθέτει τον ακριβή καθορισμό των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά αλλά και την ακριβή γνώση της θρεπτικής αξίας των ζωοτροφών.

Για την κατάρτιση των παρακάτω βιολειτουργικών ζωοτροφών, χρησιμοποιήθηκαν συστατικά που περιέχουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες που πληρούν τις ενεργειακές ανάγκες και εξασφαλίζουν την υγεία των χοιριδίων, καθώς επίσης ενσωματώθηκαν, ως πρόσθετες ύλες, βιοδραστικά συστατικά φυτικής προέλευσης με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή τα συγκεκριμένα βιοδραστικά συστατικά, δηλαδή η πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει μεγάλη ποικιλία ευεργετικών και θεραπευτικών ωφελειών.

Η διατροφή των χοιριδίων με τις συγκεκριμένες βιολειτουργικές ζωοτροφές αναμένουμε να βοηθήσει σημαντικά ειδικότερα στην ηλικία απογαλακτισμού όπου τα νεαρά ζώα είναι επιρρεπή σε ασθένειες λόγω της μειωμένης αντιοξειδωτικής τους άμυνας και εξαιτίας του στρες απογαλακτισμού.

### **3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος**

Ένα καλό ενσίρωμα διαθέτει ένα ανοικτό καφέ στο χρώμα, έχει μια έντονη γεύση και μυρίζει ελάχιστα όταν το γαλακτικό οξύ που περιέχει βρίσκεται στην σωστή ποσότητα. Είναι πολύ σταθερό και μπορεί να διατηρηθεί για χρόνια, εάν απαιτείται υπό την προϋπόθεση ότι το οξυγόνο περιορίζεται από το υλικό. Για την καλύτερη



ζύμωση, η ξηρά τροφή που χρησιμοποιείται πρέπει να έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η κοπή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί όταν το περιεχόμενό τους σε υδατάνθρακες (διαλυτά σάκχαρα) είναι υψηλό και όταν το φυτό μπορεί να μαραθεί γρήγορα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3% κατά την κοπή και το φυτό θα πρέπει να μαραθεί έως ότου η περιεκτικότητά του σε υγρασία από 80% κατέβει στο 70-75%. Σε αυτό το ποσοστό εξασφαλίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και η ασφαλέστερη ενσίρωση. Συνήθως το κατάλληλο pH για ένα καλό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο από 4,1.

### 3.2.3 Παρασκευή Ενσίρωματος Καλαμποκιού

Το ενσίρωμα καλαμποκιού παρασκευάστηκε πριν την δημιουργία των ζωοτροφών και η σύστασή του αποτελείται από: καλαμπόκι (άλυρο), και νερό. Η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια έτσι ώστε στο τελικό ενσίρωμα να έχουμε ποσοστό 60% στερεών και έτσι γι' αυτόν τον σκοπό πριν την ανάμιξη συνυπολογίστηκαν τα ποσοστά υγρασίας του καλαμποκιού. Κατά την παρασκευή του ενσίρωματος προστέθηκαν και βακτήρια (*Lactobacillus*) τα οποία σε αναερόβιες συνθήκες προκαλούν ζύμωση.

Το ενσιρωμένο καλαμπόκι περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας, οργανικά οξέα, όπως γαλακτικό οξύ και χορηγείται στα ζώα σαν χονδροειδής ζωοτροφή. Η ενσίρωση είναι η διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό ποσοστό υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας, για χρήση ως ζωοτροφή. Κατά την ενσίρωση δημιουργούνται όξινες συνθήκες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της υγρασίας και της γεύσης τους.

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

ενσιρώματος με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης.

Κατά την διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας λαμβάνονταν δείγματα έτσι ώστε να γίνεται ο έλεγχος του pH του ενσιρώματος. Το pH το οποίο πρέπει να έχει το τελικό ενσίρωμα πρέπει να είναι μικρότερο του 4,1. Επίσης το τελικό προϊόν της ενσίρωσης έχει πιο σκούρο χρώμα από το αρχικό και τα βακτήρια σταματούν την αντίδραση με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα μέσα στην σακούλα που βρίσκεται το τελικό προϊόν.

Η μέτρηση του pH έγινε με 2 μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/10 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 1 γραμμάριο ενσιρώματος προστίθενται 9 ml απεσταγμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται έντονα σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά. Τέλος μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν 3,82. Με την δεύτερη μέθοδο γίνεται αραιώση 1/2 του ενσιρώματος. Δηλαδή σε 5 γραμμάρια ενσιρώματος προστίθενται 5 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για τουλάχιστον 20 λεπτά και τέλος μετρήθηκε το pH. Το pH του ενσιρώματος με την δεύτερη μέθοδο ήταν 3,80. Όπως φαίνεται και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες τιμές pH και συνεπώς η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης στο ενσίρωμα είχε ολοκληρωθεί και ήταν πλέον έτοιμο για να προστεθεί στο σιτηρέσιο.

#### **3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων**

Για τις ανάγκες του πειράματος παράχθηκαν τα ακόλουθα σιτηρέσια, τα οποία ήταν ισοενεργειακά και ισοπρωτεϊνικά και ισόρροπα ως προς τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων χοιριδίων. Να επισημανθεί ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ενσωματώθηκε στο σιτηρέσιο με τη μορφή σκόνης. Η σύστασή τους περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 1:** Τα πειραματικά σιτηρέσια της ομάδας control και της ομάδας whey.

<b>ΟΜΑΔΑ CONTROL</b>	
<b>ΖΩΟΤΡΟΦΗ</b>	<b>%</b>
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	48,5
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	20
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ	8
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ (2,5%)	2,5
ΣΥΝΟΛΟ	100

<b>ΟΜΑΔΑ WHEY</b>	
<b>ΖΩΟΤΡΟΦΗ</b>	<b>%</b>
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	53,5
ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ	21
ΟΡΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	5
WHEY PROTEIN CONC (80)	10
ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ	8
ΙΣΟΡΡΟΠΙΣΤΗΣ (2,5%)	2,5
ΣΥΝΟΛΟ	100

### **3.2.5 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (in vitro) των παρασκευασμένων ζωοτροφών για τα νεαρά χοιρίδια**

Η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πειραματικών ζωοτροφών πραγματοποιήθηκε, τόσο για την ζωοτροφή control όσο και για την εμπλουτισμένη ζωοτροφή, σύμφωνα με τις εξής μεθόδους:

#### **i) Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH**

Η μέθοδος του DPPH βασίζεται στη χρήση της ρίζας του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία μιας αντιοξειδωτικής ένωσης που λειτουργεί ως δότης

ιόντων υδρογόνου, η παραπάνω ρίζα (DPPH<sup>\*</sup>) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (Apostolou *et al.*, 2013).

## ii) Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS

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

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

### 3.3 Ιστοληψία - Αιμοληψία

Οι σφαγές, πραγματοποιήθηκαν από εξειδικευμένο προσωπικό στο σφαγείο της Λάρισας στην περιοχή Γυρτώνη, ακολουθώντας τους απαραίτητους κανονισμούς περί χειρισμού, μεταφοράς και θανάτωσης εργαστηριακών ζώων, που πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα ζώα να υποστούν την λιγότερη καταπόνηση καθώς και λιγότερο άγχος. Πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες ηλικίες των ζώων, μετά τη γέννησή τους, με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής άμυνας (**πρόωρη ηλικία, 2 και 20 ημερών**) (**4 ζώα σε κάθε σφαγή**), την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στην ευζωία (**απογαλακτισμός, 35 ημερών**) (**10 ζώα**) και τέλος, με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των βιολειτουργικών ζωοτροφών στο τελικό βάρος (**βάρος σφάγιου, 50 μέρες**) (**10 ζώα**).

### **Υλικά:**

- Μιας χρήσεως σύριγγες με βελόνα (PentaFerte®), χωρητικότητας 5 ml, που μετά τη χρήση τους απομακρύνονταν σε δοχεία περισυλλογής αιχμηρών αντικειμένων.

- Μιας χρήσεως αποστειρωμένα σωληνάρια συλλογής αίματος, (BDVacutainer® EDTATubes, με Ref. nr. 3668860), που περιείχαν 7,2mg K3E. Το αντιπηκτικό EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα με χηλίωση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.

Το αίμα από τα χοιρίδια και τα πρόβατα λαμβάνονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα, αφού είχε προηγηθεί αναισθησία και θανάτωση σύμφωνα με τους κανονισμούς περί θανάτωσης εργαστηριακών ζώων. Το αίμα μεταφέρονταν σε σωληνάρια συλλογής, που περιείχαν αντιπηκτικό και ανακατεύονταν απαλά αναστρέφοντας τον σωλήνα αρκετές φορές. Αυτό διασφάλιζε τη σωστή ανάμιξη του αντιπηκτικού με το αίμα. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο που έφεραν παγοκύστες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο άμεσα, μετά το πέρας της αιμοληψίας.

Οι ιστοί των ζωτικών οργάνων της καρδιάς και του τετρακέφαλου αφαιρέθηκαν χειρουργικά με τη βοήθεια νυστεριού, μεταφέρθηκαν σε ειδικές κασέτες, σε υγρό άζωτο και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους.



**Εικόνα 14:** Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

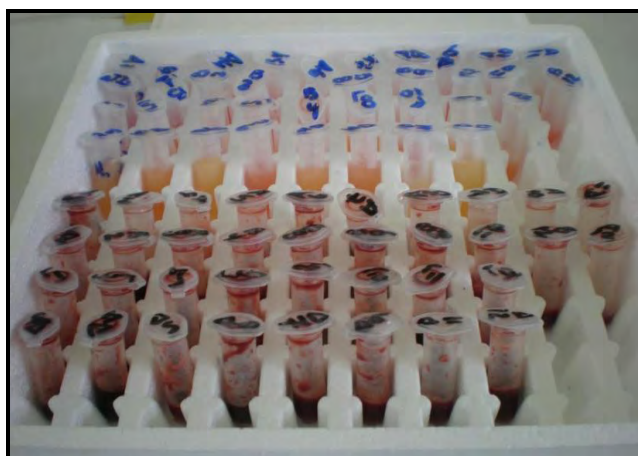
### **3.3.1 Επεξεργασία αίματος**

Στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελούνταν επεξεργασία των δειγμάτων, σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο, για τη συλλογή αιμολύματος και πλάσματος και φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους (Εικόνα 24). Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης

γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και στο πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

### **Περιγραφή Μεθόδου.**

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370g, για 10 λεπτά, στους 4°C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρωση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020g, για 15 λεπτά, στους 4°C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20μL).
6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20°C.



**Εικόνα 15:** Διατήρηση πλάσματος και αιμόλυματος σε φιαλίδια Eppendorf.

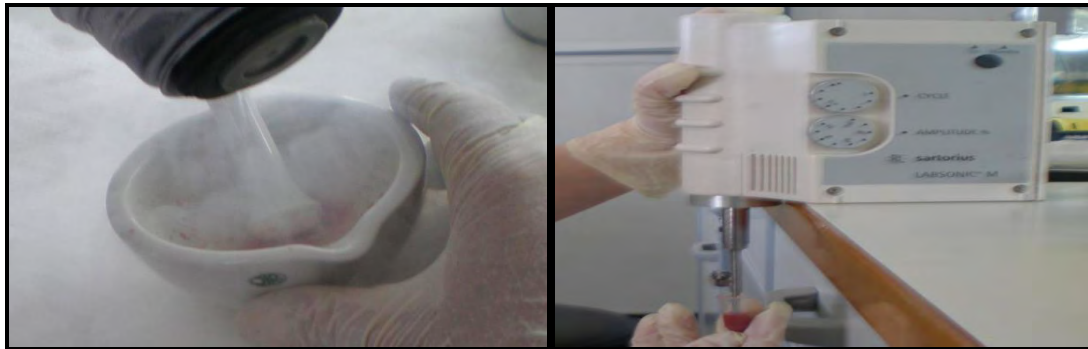
Στη συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα **για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.**

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

### 3.3.2 Ομογενοποίηση ιστών

Η ομογενοποίηση τόσο του τετρακέφαλου όσο και του καρδιακού ιστού εκτελέστηκε με δύο μεθόδους.

**A) Με γουδί και γουδοχέρι:** Αρχικά, πήραμε ένα μικρό μέρος του παγωμένου ιστού από το ψυγείο των  $-80^{\circ}\text{C}$  και τον κονιορτοποιήσαμε στο γουδί με το γουδοχέρι. Συγχρόνως, προσθέταμε στο γουδί ανά τακτά χρονικά διαστήματα υγρό άζωτο. Όταν θρυμματίστηκε τελείως, τον ζυγίσαμε και τον προσθέσαμε σε Eppendorf μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 σε αναλογία 1:2. Το PBS περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA, καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Diagnostics GmbH). Οι πρωτεάσες αυτές ήταν η Απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, η Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη, η PMSF (9mg/mL) και άλλες. Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης (με σπάσιμο μεμβρανών) και φυγοκεντρήθηκε (15.000g, 5min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Η φύλαξή όλων των ομογενοποιημένων ιστών πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



**Εικόνα 16:** Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ομογενοποίηση.

**B) Με ομογενοποιητή:** Μέσα σε falcon προσθέσαμε περίπου 0,5-0,6g ιστού και PBS σε αναλογία 1:2 και πραγματοποιήσαμε ομογενοποίηση με τον ειδικό ομογενοποιητή. Ακολούθως, προσθέσαμε το μείγμα σ' ένα Eppendorf και το ομογενοποιήσαμε περαιτέρω με υπερήχους. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση (15.000g, 5min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), πήραμε το υπερκείμενο και το προσθέσαμε σε νέα Eppendorf. Τέλος, αφότου ομογενοποιήθηκαν όλοι οι ιστοί, διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



**Εικόνα 17:** Ο ομογενοποιητής.

### 3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

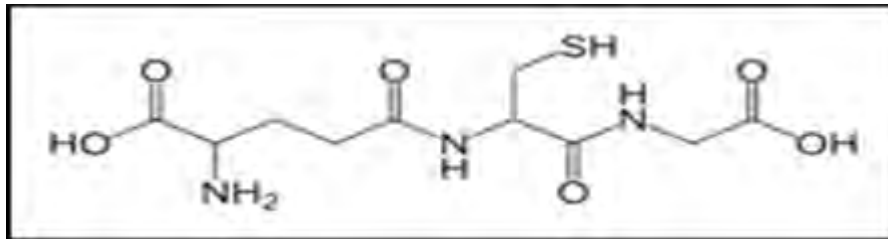
#### 3.4.1 Γενικά

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

#### 3.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης

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



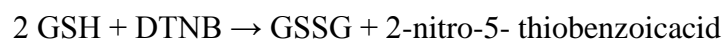


Εικόνα 18: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

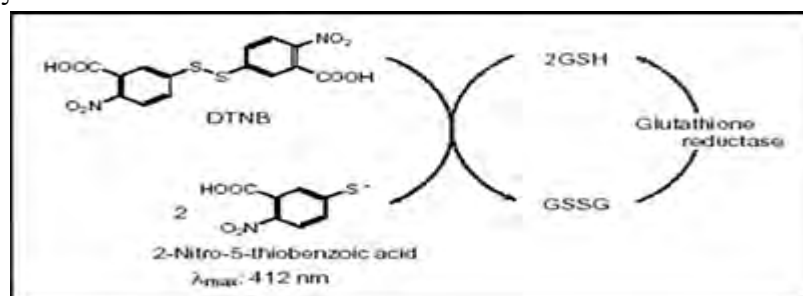
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battinet *al.* 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων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

### Αρχή της μεθόδου

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



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



Εικόνα 19: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

### Αντιδραστήρια

- **Phosphatebuffer** 67mM (pH 7,95). MB (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178.

Για να δημιουργήσουμε 500mL από το phosphatebuffer φτιάχνουμε 25mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (67mM) και 500mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε

0,227g και τα διαλύουμε σε 25mL νερού. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 5,94g και τα διαλύουμε σε 475mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.

- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6mg DTNB σε 100ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35
- **Κιτρικό Νάτριο**. (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>\*2H<sub>2</sub>O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294,10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

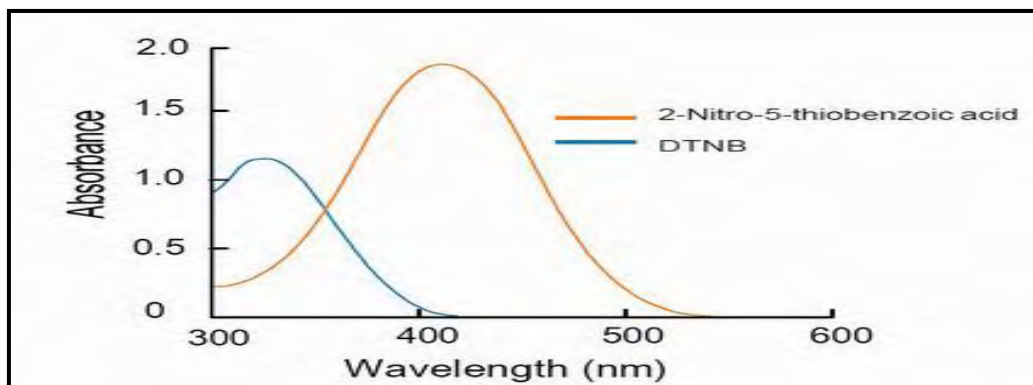
### Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

**Πίνακας 2:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH.

	Blank	Sample
<b>Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95</b>	<b>660 μL</b>	<b>660 μL</b>
<b>DTNB 1 mM</b>	<b>330 μL</b>	<b>330 μL</b>
<b>Απεσταγμένο νερό</b>	<b>20 μL</b>	-
<b>Ομογενοποιημένος Ιστός ή Αίμα</b>	-	<b>20 μL</b>

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



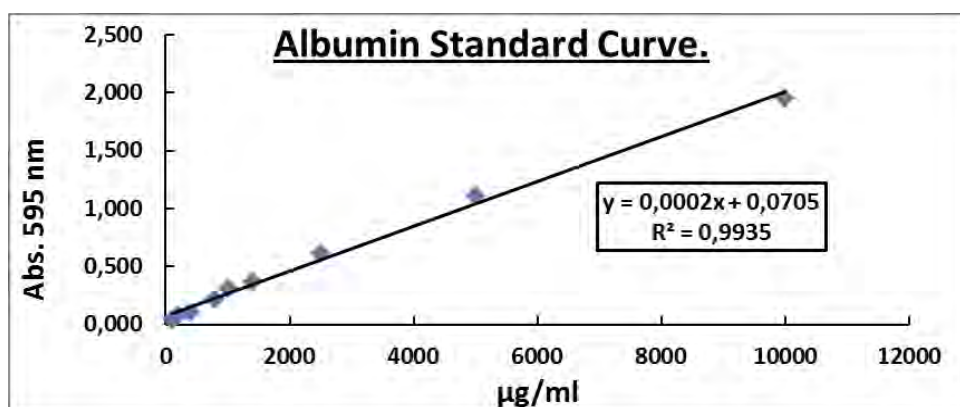
Εικόνα 20: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θεοβενζοϊκού οξέος (DojindoMolecularTechnologies).

### Α)Υπολογισμοί για ιστούς

Δραστικότητα GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mgtotalprot.}$ ) =  $(\text{Absδείγματος} - \Delta\text{abstυφλού}/13.6) \times 2 \times 3$  (λόγω αραιώσεων)  $\times 50.5 / \text{Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL)}$ .

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του ιστού (20 $\mu\text{L}$ ) (1010/20=50.5), πολλαπλασιάζουμε με 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

## **B) Υπολογισμοί για ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα**

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

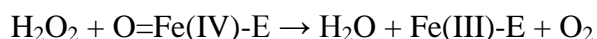
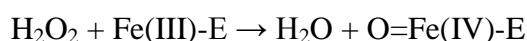
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της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

### **3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης**

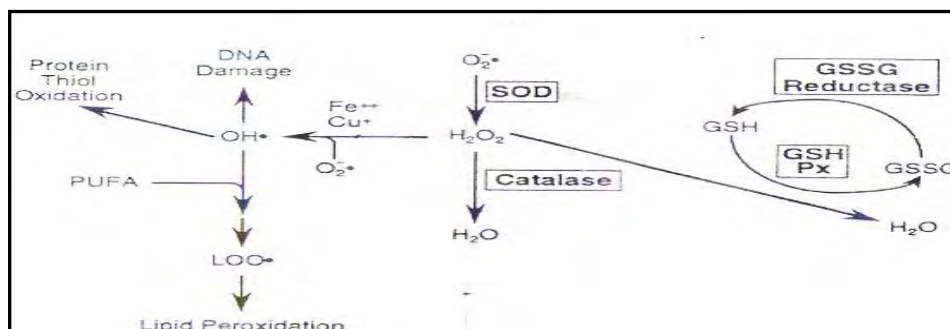
#### **Αρχή της μεθόδου**

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani *et al.* 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon *et al.* 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από την καταλάση είναι η ακόλουθη: 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 2 H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



**Εικόνα 21:** Μονοπάτι αναγωγής του  $\text{H}^2\text{O}^2$  σε  $\text{H}^2\text{O}$ .

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το  $\text{H}_2\text{O}_2$  για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών ( $\text{H}_2\text{A}$ ) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

*CAT*



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

### Διαλύματα

**Phosphatebuffer 67mM (pH 7.4)** MB ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 136 και MB ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 178. Για να παρασκευάσουμε 500mL του phosphatebuffer ξεκινάμε πρώτα με 100mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (67mM) και 400mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (67mM). Για το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ζυγίζουμε 0.91g και τα διαλύουμε σε 100mL νερού. Για το  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ζυγίζουμε 4.77g και τα διαλύουμε σε 400mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

### 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Το διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι έτοιμο προς χρήση.

### Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

**Πίνακας 3:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ιστό.

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2955 $\mu\text{L}$
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 $\mu\text{L}$

**Πίνακας 4:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

	Δείγμα
Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4	2991 $\mu\text{L}$
αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 $\mu\text{L}$

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

#### A) Υπολογισμοί για ιστούς

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mgHb) = ( $\Delta\text{Abs}_{\text{sample}}$  per min / 40) x (75 x 1000 x 3 x 2) / Conc. Protein (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 75 είναι ο παράγοντας αραιώσεως που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του δείγματος (40 $\mu\text{L}$ ) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.  $\Delta\text{Abs}$  = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$ .  $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$  είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού (One Unit decomposes one micromole of hydrogen peroxide per minute at  $25^{\circ}\text{C}$  pH 7.0).

### **B) Υπολογισμοί για ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα**

Δραστικότητα της καταλάσης ( $U/\text{mgHb}$ ) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$ .

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του αιμολύματος (4 $\mu\text{L}$ ) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10 x 2, την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta\text{Abs (min)}$  = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

### **3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)**

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

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος

επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

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

### **Αρχή της μεθόδου**

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

### **Διαλύματα**

- **Phosphatebuffer 10mM (pH 7.4).** MB (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 και MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178. Για να φτιάξουμε 500mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10mM) και 400mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.136g και τα διαλύουμε σε 100mL νερό. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.712g και τα διαλύουμε σε 400mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- **DPPH 0.1mM.** MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02g DPPH σε 5mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200μL του 10mM διαλύματος του DPPH σε 19.8mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο



οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

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

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

### **Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα**

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

**Πίνακας 5:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC σε ιστό.

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

**Πίνακας 6:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC σε πλάσμα.

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

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυβελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι

πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

### **A) Υπολογισμοί για ιστούς**

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

ii)  $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5] / 1000$ .

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25 πλάσια ( $1000\mu\text{L}$  στην κυψελίδα /  $40\mu\text{L}$  ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

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

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

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:  
 $\text{mmol DPPH} / \text{mgtotalprot}$ .

### **B) Υπολογισμοί για πλάσμα**

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

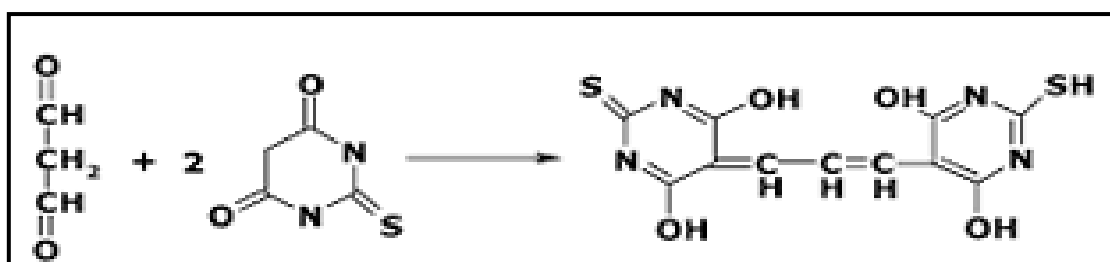
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

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

### 3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

#### Αρχή της μεθόδου.

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



Εικόνα 22: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

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

#### Διαλύματα

- **Tris-HCl 200mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25mL Tris (200mM) και 42mL HCl (0.1N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61g και τα διαλύουμε σε 25mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42mL του stock 37% HCl (10.1N) σε 42mL

νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

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

- **Διάλυμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 0.08g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

### **Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα**

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15ml) προσθέτουμε 100μL ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος για τα δείγματα και απεσταγμένο νερό για το τυφλό. Προσθέτουμε 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επιάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – TBA και επιάζουμε στους 95°C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

### **A) Υπολογισμοί για ιστούς**

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης\* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με

$10^{-6}$  με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε  $\mu\text{mol/L}$ . Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 ξανά επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

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

## **B) Υπολογισμοί για πλάσμα**

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

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

### **3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια**

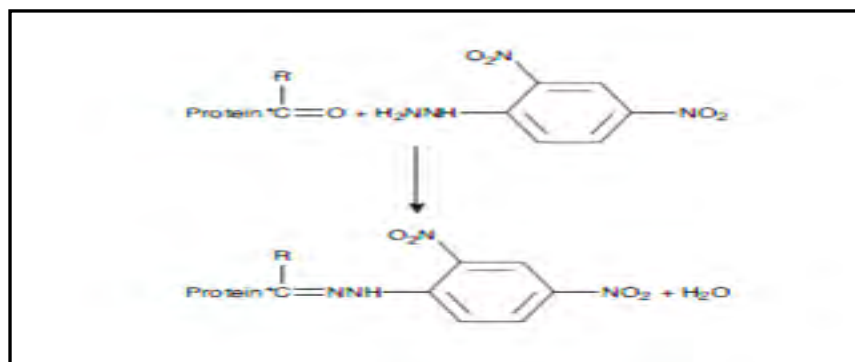
#### **Αρχή της μεθόδου**

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

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

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA

πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPΗ (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο (Patsoukis *et al.* 2004).



**Εικόνα 23:** Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPΗ (δινιτροφαινυλαδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

### Διαλύματα

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

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

- **DNPΗ 14mM.** (MB: 198.1)

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

- **Ουρία 5M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100mL 5M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30g ουρίας in  $\approx 70\text{mL}$  απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100mL με απεσταγμένο νερό.

## Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5mL του 14mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 0.5mL 2.5N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C.

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

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

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

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

### A) Υπολογισμοί για ιστούς

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

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22mM x cm<sup>-1</sup>. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα /50μL δείγματος).

Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό – ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά).

### **B) Υπολογισμοί για πλάσμα**

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

### **3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford**

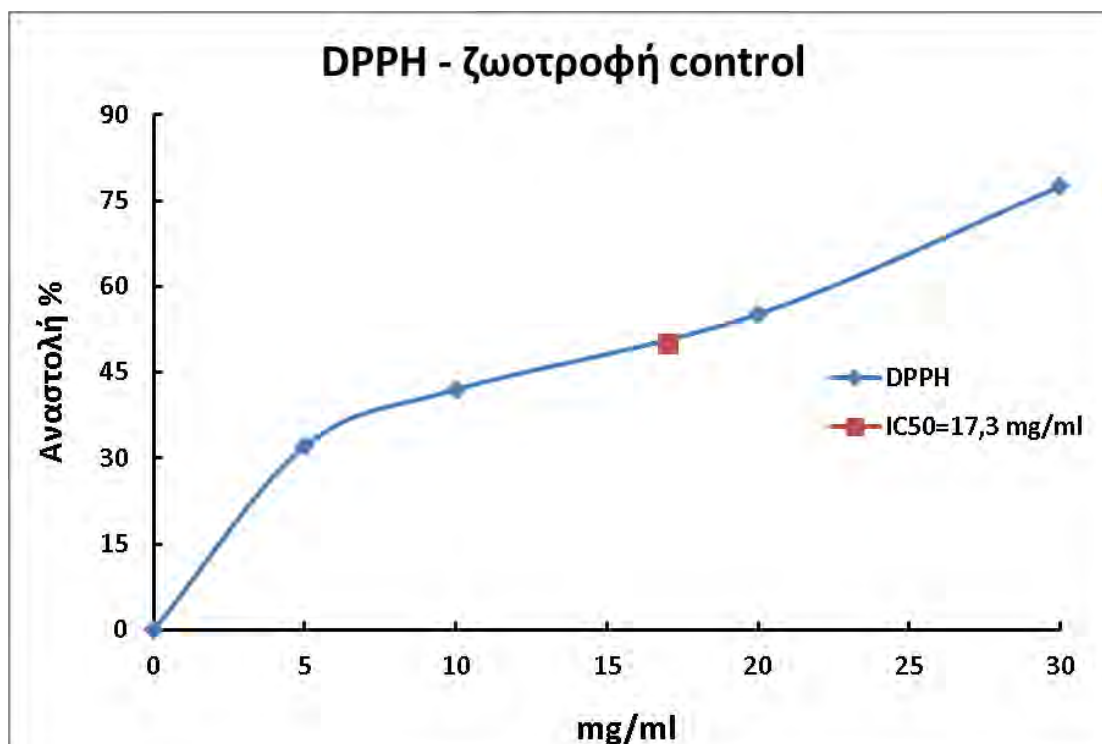
Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie 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 (Bradford M.M 1976)



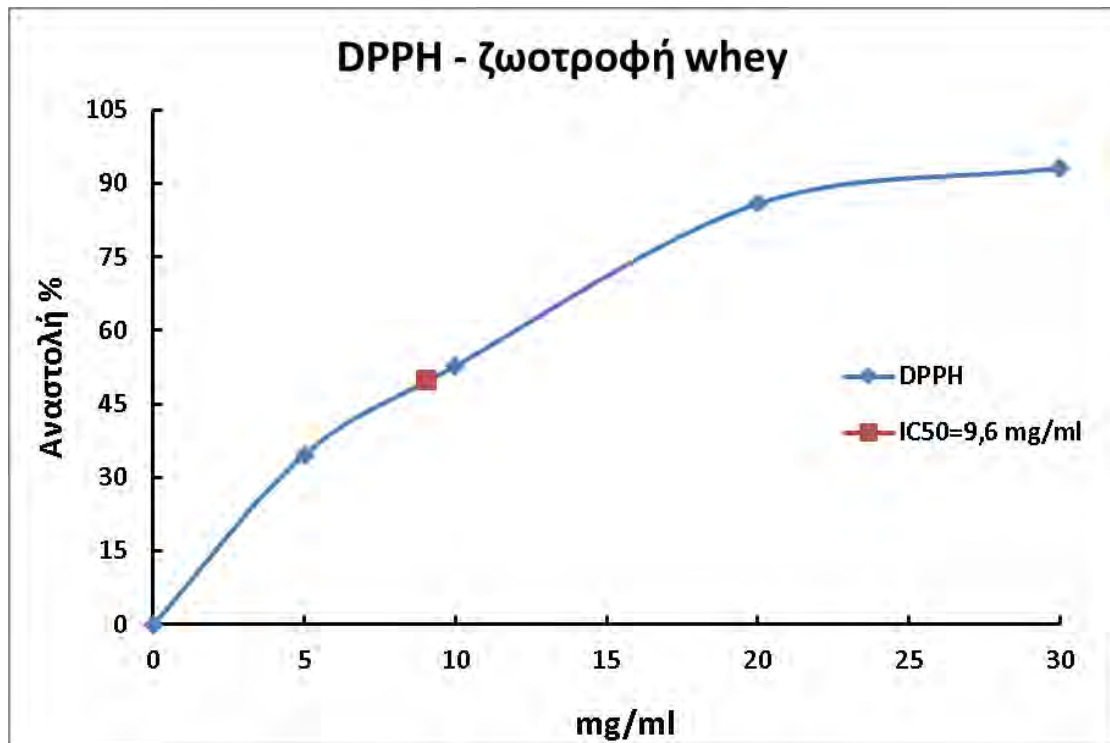
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πειραματικών ζωοτροφών για τους χοίρους

Παρακάτω παρατίθενται οι γραφικές παραστάσεις οι οποίες απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH, ABTS σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των ζωοτροφών.

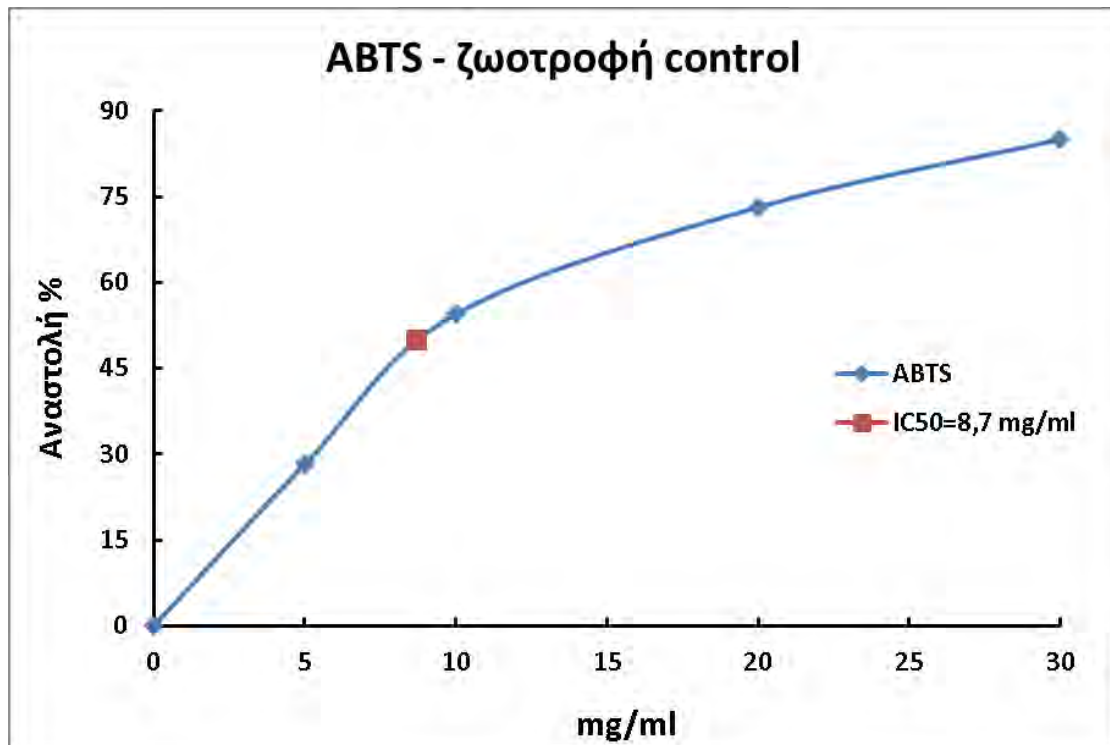


**Διάγραμμα 2:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.

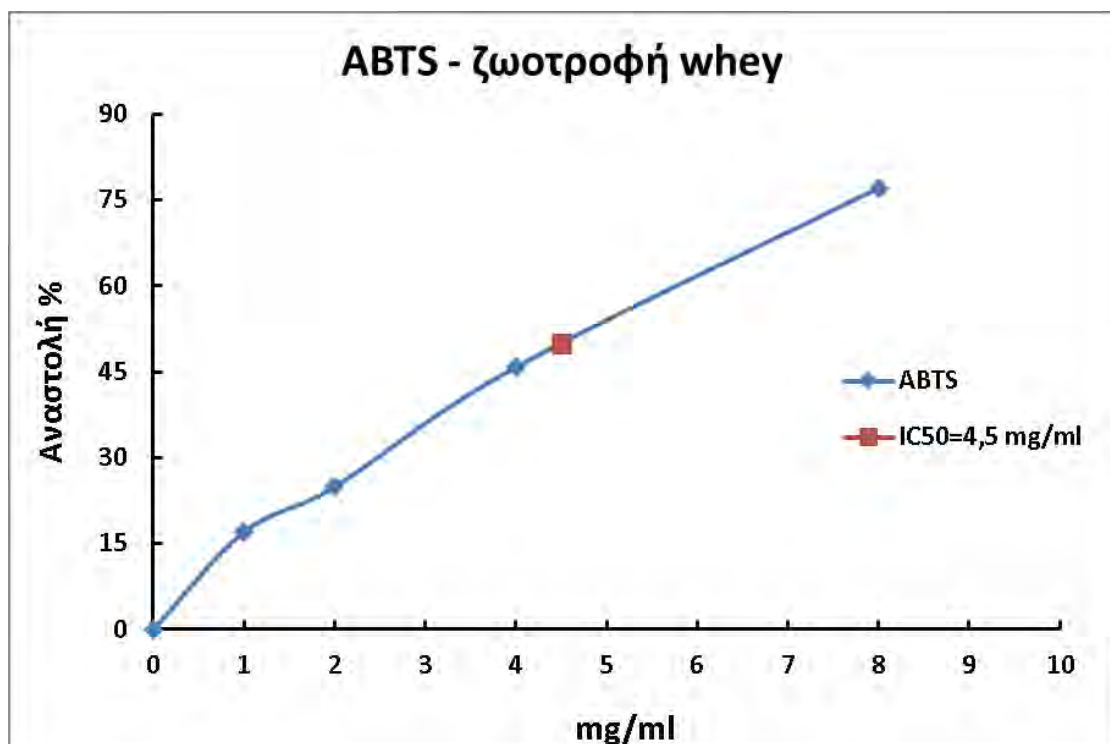


**Διάγραμμα 3:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με whey.

Από τις γραφικές παραστάσεις (Διάγραμμα 2, 3) παρατηρείται ότι με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH, η ζωοτροφή εμπλουτισμένη με τα υποπροϊόντα τυροκομείας (whey) παρουσιάζει τιμή  $IC_{50} = 9,6$  mg/ml, ενώ η ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου παρουσιάζει τιμή  $IC_{50} = 17,3$  mg/ml. Κατά συνέπεια, η ζωοτροφή με whey παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα (διπλάσια) σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.



**Διάγραμμα 4:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής της ομάδας ελέγχου.



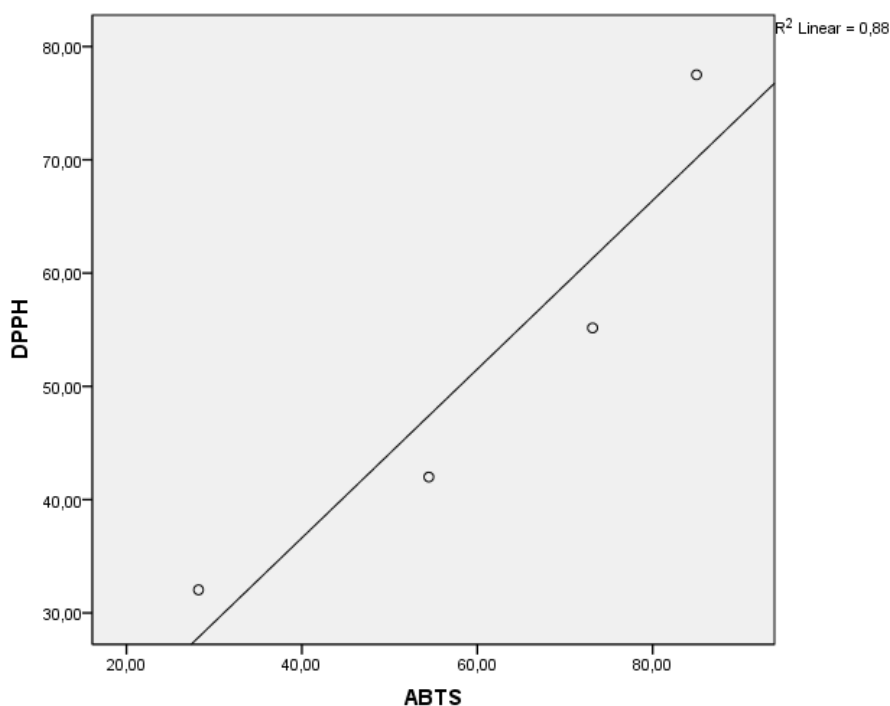
**Διάγραμμα 5:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η % εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ζωοτροφής εμπλουτισμένη με whey.

Με την μέθοδο της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS (Διάγραμμα 4, 5) οι τιμές  $IC_{50}$  είναι πιο χαμηλές ( $IC_{50}=8,7$  mg/ml (ομάδα ελέγχου) και  $IC_{50}=4,5$  mg/ml) σε σύγκριση με αυτές της ρίζας του DPPH, το οποίο οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν με διαφορετικό τρόπο την ρίζα του ABTS σε σχέση με εκείνη του DPPH. Και σε αυτή, όμως, την περίπτωση η δραστικότητα της ζωοτροφής που είναι εμπλουτισμένη με whey είναι διπλάσια σε σχέση με την ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου.

#### 4.1.1 Συσχέτιση των δύο μεθόδων κατά Spearman

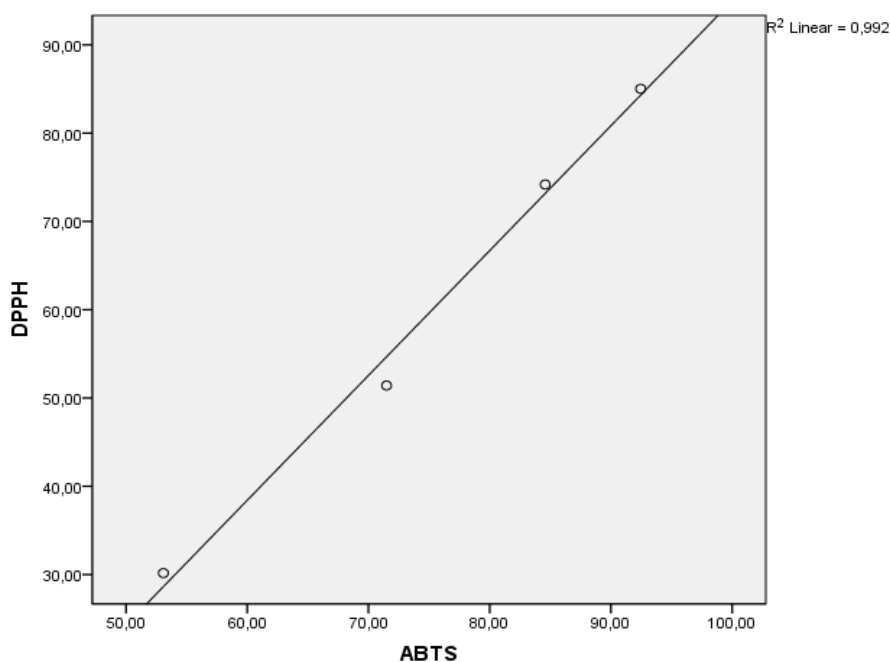
Για την συσχέτιση των δύο ζωοτροφών και τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες DPPH και ABTS, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής SPSS18. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

#### Ζωοτροφή ομάδας ελέγχου (control)



**Διάγραμμα 6:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών  $IC_{50}$  της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,05$ ).

### Ζωοτροφή εμπλουτισμένη με whey protein

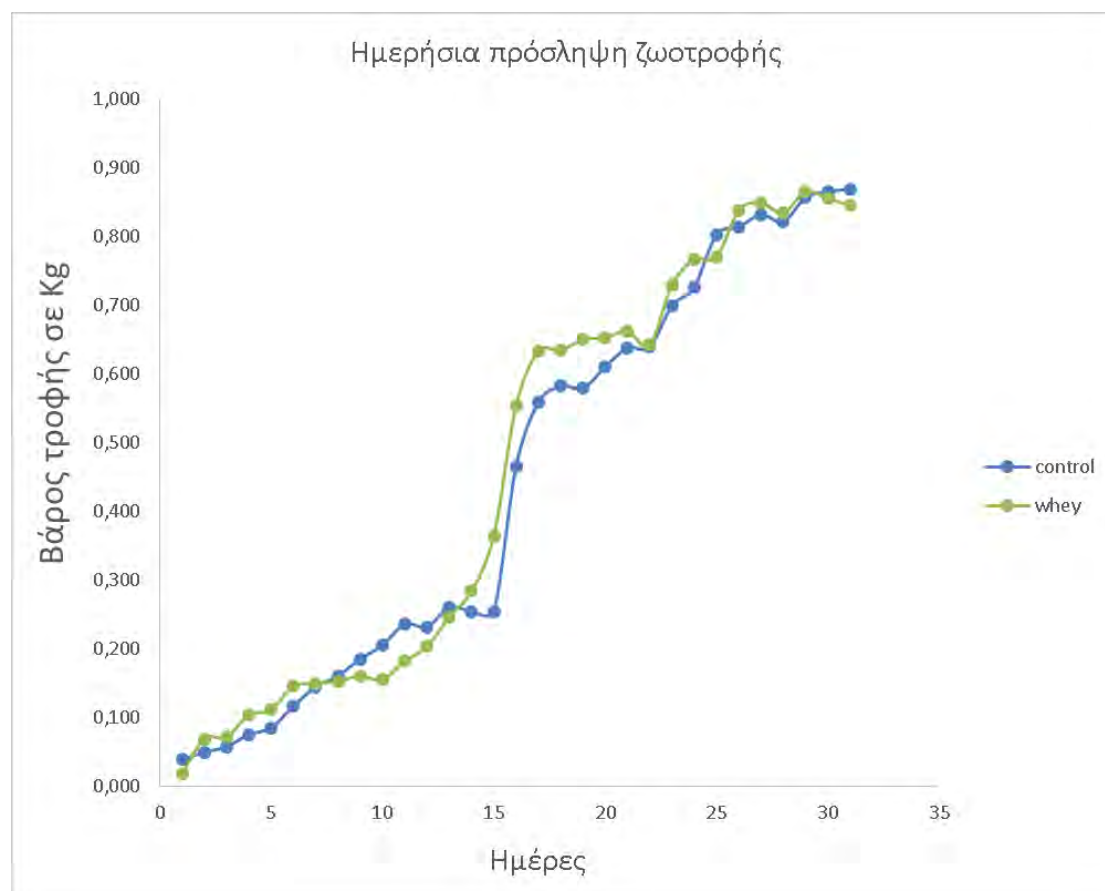


**Διάγραμμα 7:** Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συσχέτιση των τιμών  $IC_{50}$  της μεθόδου DPPH με τη μέθοδο του ABTS ( $r = 0,992$ ,  $p < 0,05$ ).

Υπολογίζοντας τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman, ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους (DPPH, ABTS), τόσο στην ζωοτροφή της ομάδας ελέγχου ( $r=0,88$ ) όσο και στην ζωοτροφή εμπλουτισμένη με το ενσίρωμα whey ( $r=0,992$ ), παρατηρείται μια μεγάλη συσχέτιση που σημαίνει ότι τα ίδια πιθανώς βιοδραστικά συστατικά των ζωοτροφών εξουδετερώνουν και τις δύο ρίζες (Διάγραμμα 6, 7).

## 4.2 Αποτελέσματα παραγωγικών χαρακτηριστικών χοιριδίων

### 1) Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής



**Διάγραμμα 8:** Μέση ημερήσια κατανάλωση σιτηρεσίων για τα χοιρίδια.

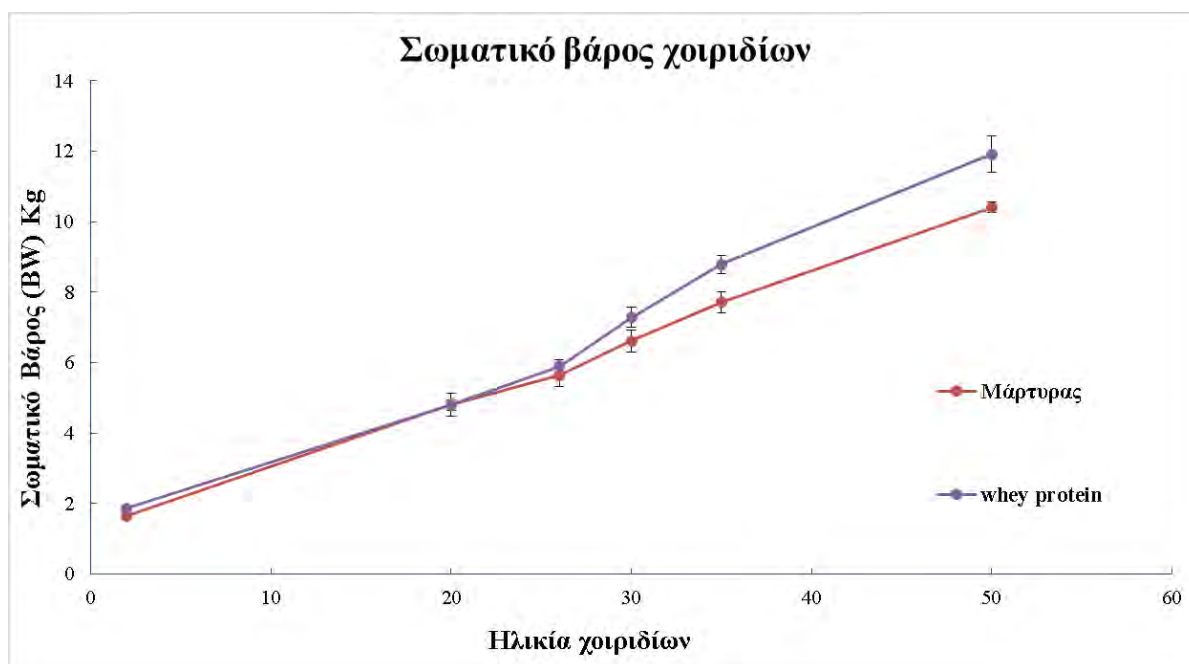
Δεδομένου ότι η διατροφή των χοιριδίων ήταν ομαδική, δεν είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της κατανάλωσης της τροφής. Ωστόσο, από το διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι η κατανάλωση είναι περίπου ίδια μεταξύ των δύο ομάδων σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τον απογαλακτισμό η κατανάλωση και των δύο ομάδων σχεδόν υπερτριπλασιάστηκε απότομα, κάτι που είναι λογικό αφού τα χοιρίδια σταμάτησαν πλέον να θηλάζουν και κατανάλωναν τα σιτηρέσια κατά τη διάρκεια όλης της μέρας.

### 2) Εξέλιξη του σωματικού βάρους χοιριδίων

Ακολουθεί ο πίνακας 6 με τους μέσους όρους των σωματικών βαρών των χοιριδίων και το διάγραμμα 9, στο οποίο παρατηρείται η εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων από την γέννηση, τον απογαλακτισμό τους και μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

**Πίνακας 7:** Σωματικά βάρη των χοιριδίων κατά την περίοδο απογαλακτισμού(*mean ± sem*)

Ημέρες μετά την γέννηση	Ομάδα μάρτυρα	Ομάδα whey
2	1,65	1,86
20	4,808±0,328	4,808±0,149
26	5,645±0,318	5,900±0,178
30	6,614±0,303	7,284±0,287
35	7,713±0,295	8,787±0,261
50	10,404±0,145	11,911±0,511



**Διάγραμμα 9:** Εξέλιξη του σωματικού βάρους των χοιριδίων στις ομάδες (μάρτυρας, whey).

Από το διάγραμμα 9 παρατηρείται ότι από τον απογαλακτισμό και μετά ο ρυθμός ανάπτυξης του σωματικού βάρους της ομάδας whey αυξήθηκε παραπάνω σε σχέση με το αντίστοιχο βάρος της ομάδας μάρτυρα.

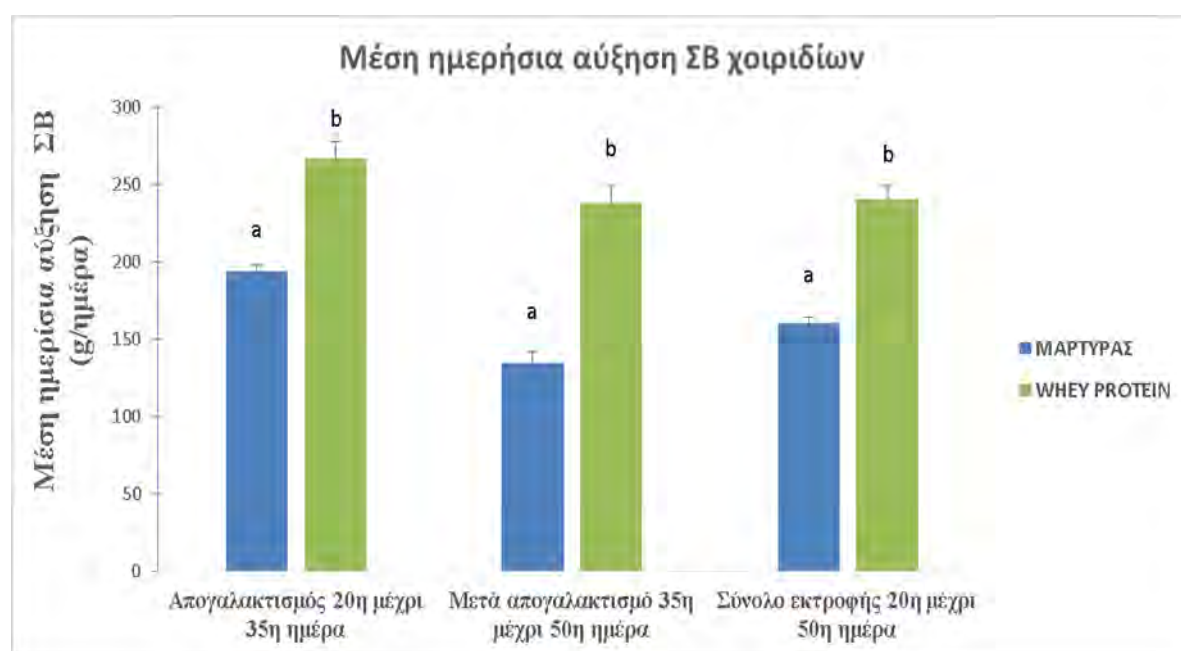
### 3) Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG)

Από την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της ημερήσιας αύξησης σωματικού βάρους, προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

**Πίνακας 8:** Μέση ημερήσια αύξηση ΣΒ (g/ημέρα) στις ομάδες των χοιριδίων στην περίοδο του απογαλακτισμού, μετά τον απογαλακτισμό και στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας.

Ομάδα	Μάρτυρας	Whey protein	P-value
ADG Απογαλακτισμός	193,70 <sup>a</sup> ±4,002	266,61 <sup>b</sup> ±11,551	<0,05
ADG Μετά Απογαλακτισμό	134,65 <sup>a</sup> ±7,437	238,19 <sup>b</sup> ±10,903	<0,05
ADG Σύνολο Εκτροφής	160,45 <sup>a</sup> ±4,091	240,46 <sup>b</sup> ±8,944	<0,05

Διαφορετικοί εκθέτες (a,b,c) δηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ .



**Διάγραμμα 10:** Ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ADG) χοιριδίων.

Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 10 παρατηρείται ότι ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης από την έναρξη της χορήγησης των πειραματικών σιτηρεσίων 20<sup>η</sup> ημέρα μέχρι τον απογαλακτισμό 35<sup>η</sup> ημέρα, καθώς και στην περίοδο μετά τον απογαλακτισμό μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας 50<sup>η</sup> ημέρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερος ( $p < 0,05$ ) στα χοιρίδια στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο, στο



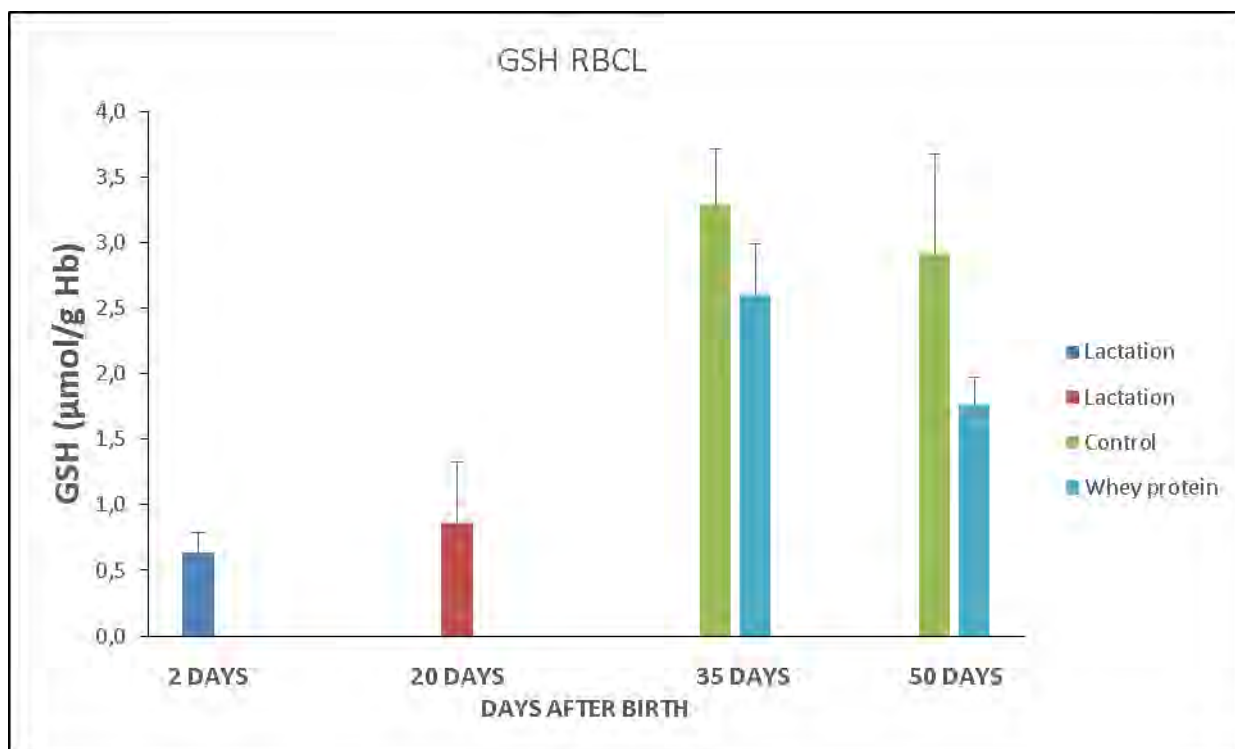
οποίο ενσωματώθηκε whey protein. Επίσης, στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας παρατηρείται ότι ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης της ομάδας whey διαφέρει και είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος ( $p < 0,05$ ) από την ομάδα του μάρτυρα.

#### ***4.2 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (καρδιά, τετρακέφαλος) στους χοίρους***

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, ως μέση τιμή  $\pm$  SEM ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS 22. Συγκεκριμένα, εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), με την επιλογή των παραμέτρων post-hoc LSD και Tukey προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε  $*p < 0.05$ .

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους ιστούς και το αίμα των χοίρων, φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η σύγκριση πραγματοποιείται στις ομάδες control και στις ομάδες whey ξεχωριστά, για την παρατήρηση των μεταβολών στα αναπτυξιακά τους στάδια, όσο και μεταξύ τους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βιολειτουργικών ζωοτροφών.

#### 4.2.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα



**Διάγραμμα 11.** Τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στο αιμόλυμα διαφορετικών ομάδων ηλικίας χοίρων κρεατοπαραγωγής.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών .

- Σύγκριση των ομάδων whey

Η δραστηριότητα της GSH στην ομάδα whey παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική μείωση μεταξύ των ζώων ηλικίας 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι:

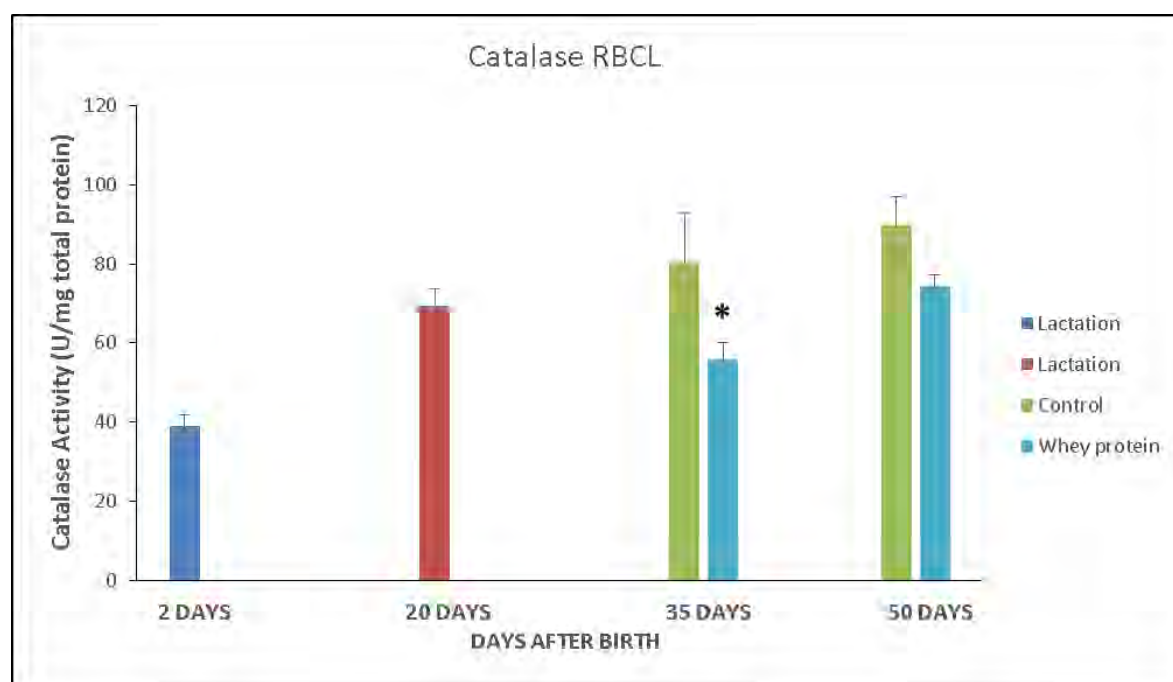
A. Στις 35 ημέρες ηλικίας δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της GSH

B. Ομοίως στις 50 ημέρες ηλικίας δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά

**Πίνακας 9.** Επίπεδα γλουταθειόνης στο αιμόλυμα στην ομάδα control και whey

<b>GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	3,287 ± 1,440	2,919 ± 0,757
whey	2,607 ± 0,384	1,759 ± 0,215

#### 4.2.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα



**Διάγραμμα 12.** Τα επίπεδα δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) στο αιμόλυμα

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Η δραστηριότητα της καταλάσης στην ομάδα whey δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

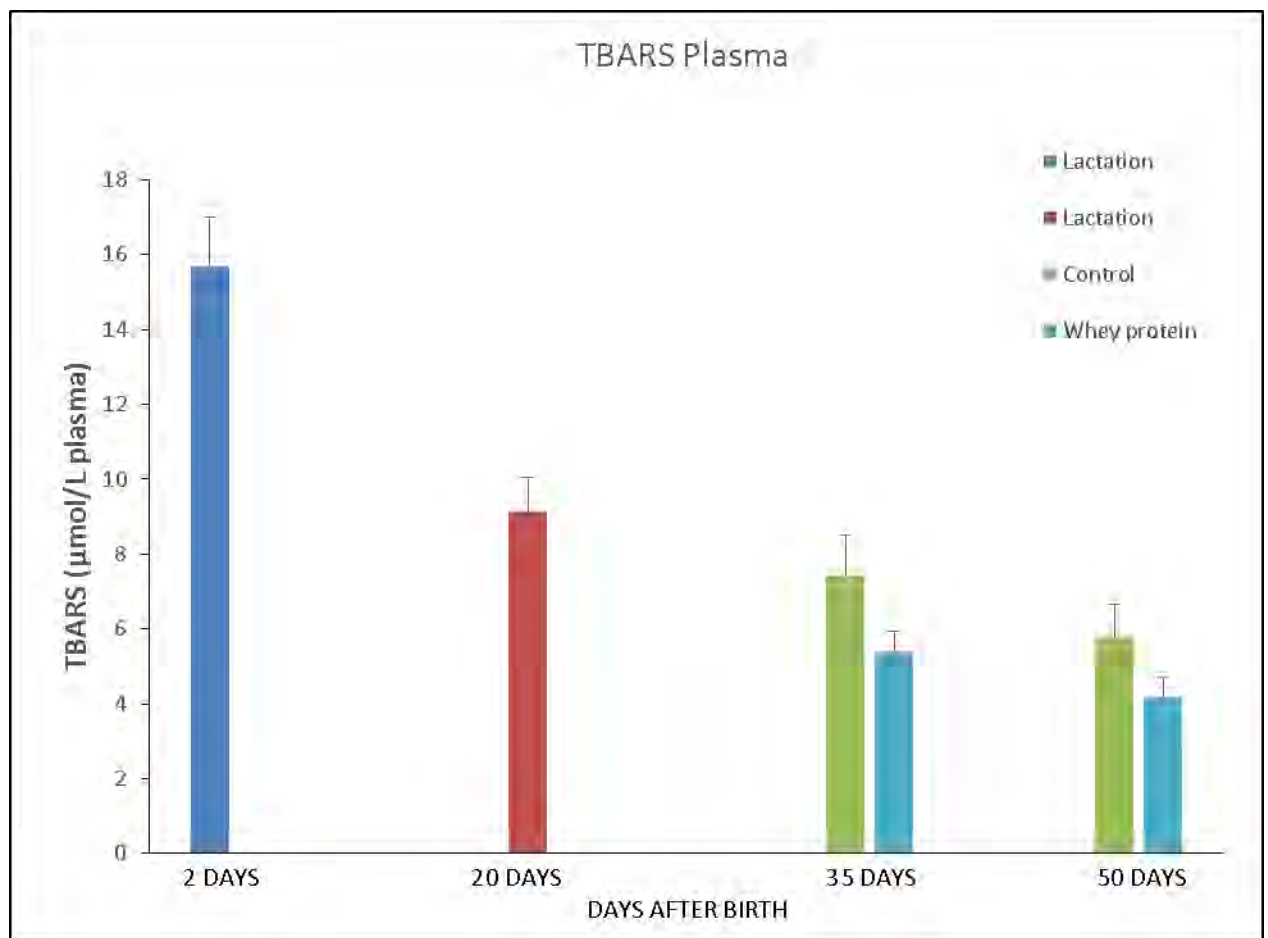
A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (30,62%) (p<0,05)** της δραστηριότητας της CAT στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

B. Στις 50 ημέρες δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της CAT μεταξύ των δύο ομάδων.

**Πίνακας 10.** Επίπεδα δραστηριότητας της CAT στο πλάσμα στην ομάδα control και whey

<b>CAT Protein)M.O. ± SEM</b> (U/mg	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
<b>Control</b>	<b>80,418± 12,571</b>	<b>89,670± 7,40</b>
<b>Whey</b>	<b>55,791 ± 4,18</b>  <b>p&lt;0,05</b>	<b>74,360± 2,86</b>

#### 4.2.3 Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα



**Διάγραμμα 13.** Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα

•Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

•Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν προκύπτει μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

•Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

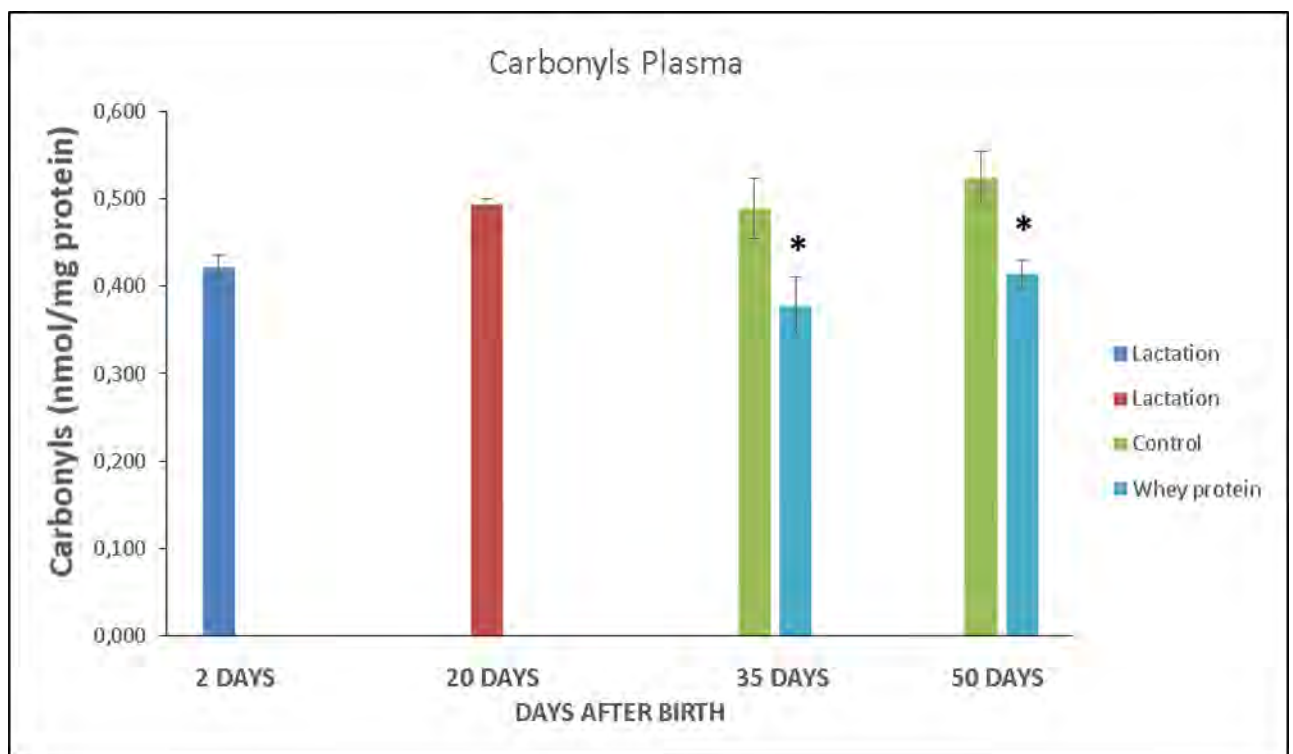
A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά

**Πίνακας 11.** Επίπεδα TBARS στο πλάσμα στην ομάδες control και whey

<b>TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	7,432 ± 1,092	5,783 ± 0,888
whey	5,405 ± 0,519	4,173 ± 0,546

**4.2.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα**



**Διάγραμμα 14.** Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα

• Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών.(πίνακας 13)

• Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των CARB στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.(πίνακας 13)

• Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

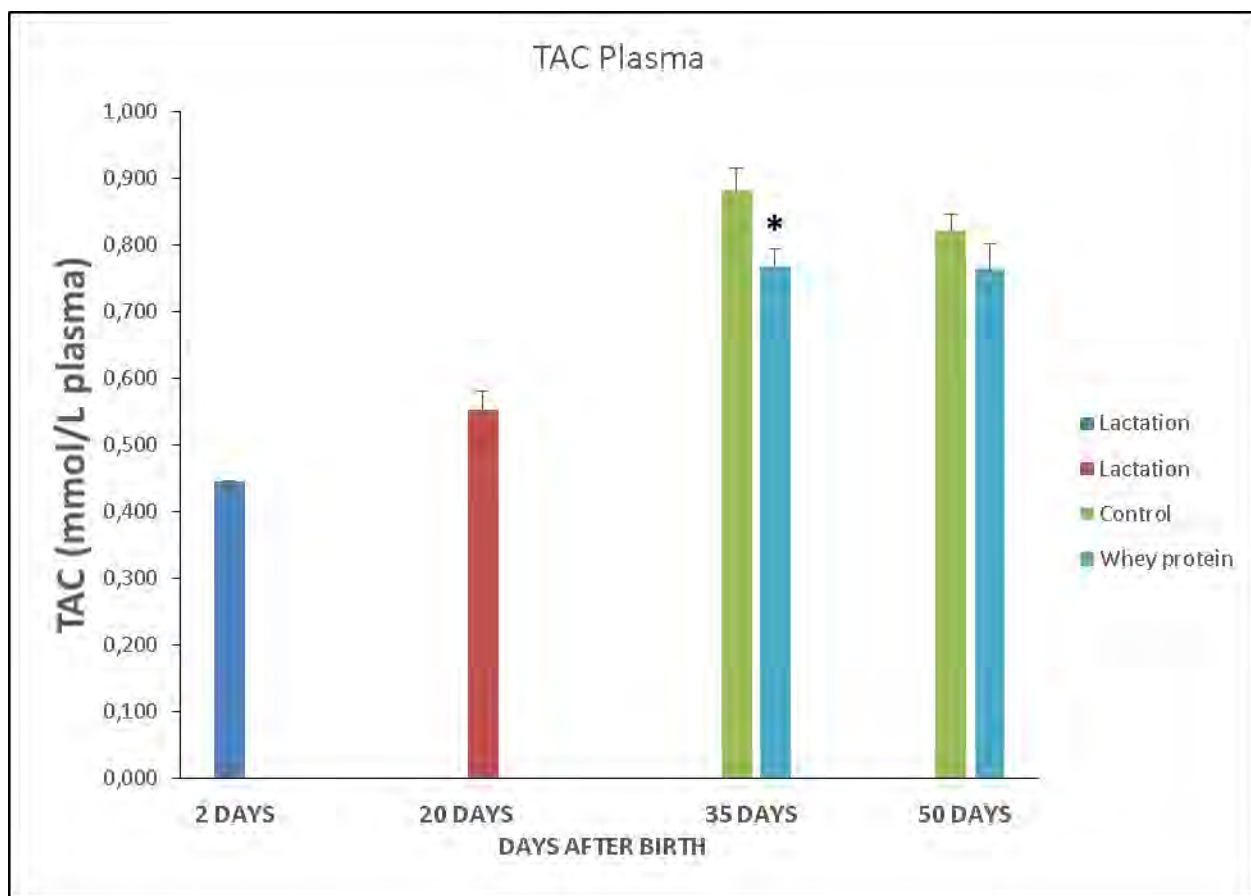
A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (22,85%) (p<0,05)** των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (21,14%) (p<0,05)** των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

**Πίνακας 12.** Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα στην ομάδα control και whey

<b>CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	0,490 ± 0,035	0,525 ± 0,030
Whey	0,378 ± 0,033 <b>P&lt;0,05</b>	0,414 ± 0,016 <b>P&lt;0,05</b>

#### 4.2.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα



**Διάγραμμα 15.** Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων control και whey.

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (12,82%)**. ( $p < 0,05$ ) της TAC στην ομάδα whey

B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

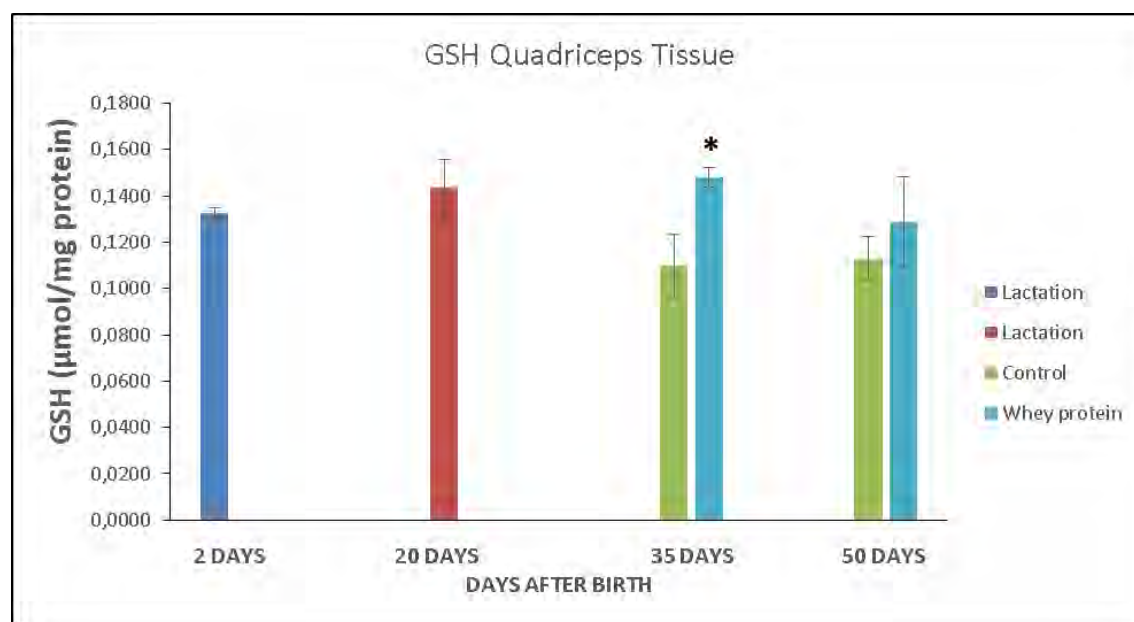


**Πίνακας 13 :** Επίπεδα της TAC στο πλάσμα στην ομάδα control και whey

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,881± 0,034	0,821± 0,026
whey	0,768 ± 0,025	0,763± 0,039
	<b>p&lt;0,05</b>	

## ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ

### 4.2.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον τετρακέφαλο ιστό



**Διάγραμμα 16.** Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στον τετρακέφαλο ιστό.

#### • Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των GSH στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των GSH στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

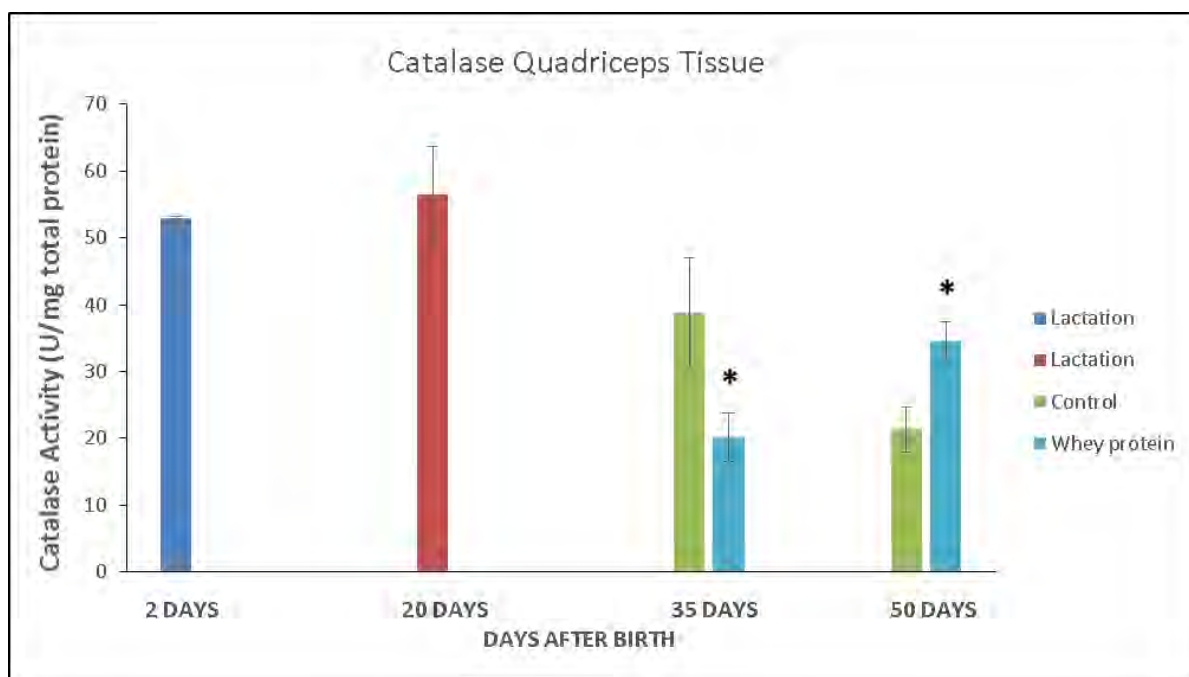
A. Στις 35 ημέρες στην ομάδα whey παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική αύξηση (34,54%) (p<0,05)** των επιπέδων της GSH σε σχέση με την ομάδα control .

B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά

**Πίνακας 14 :** Επίπεδα γλουταθειόνης στο αιμόλυμα στην ομάδα control και whey

<b>GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	0,110 ± 0,010	0,113 ± 0,016
whey	0,148 ± 0,004  <b>p&lt;0,05</b>	0,129 ± 0,019

#### 4.2.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον τετρακέφαλο ιστό



**Διάγραμμα 17.** Επίπεδα δραστικότητας της καταλάσης (CAT) στον τετρακέφαλο ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση ( $p < 0,05$ ) των επιπέδων της καταλάσης στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) των επιπέδων της καταλάσης από τις 35 στις 50 ημέρες.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

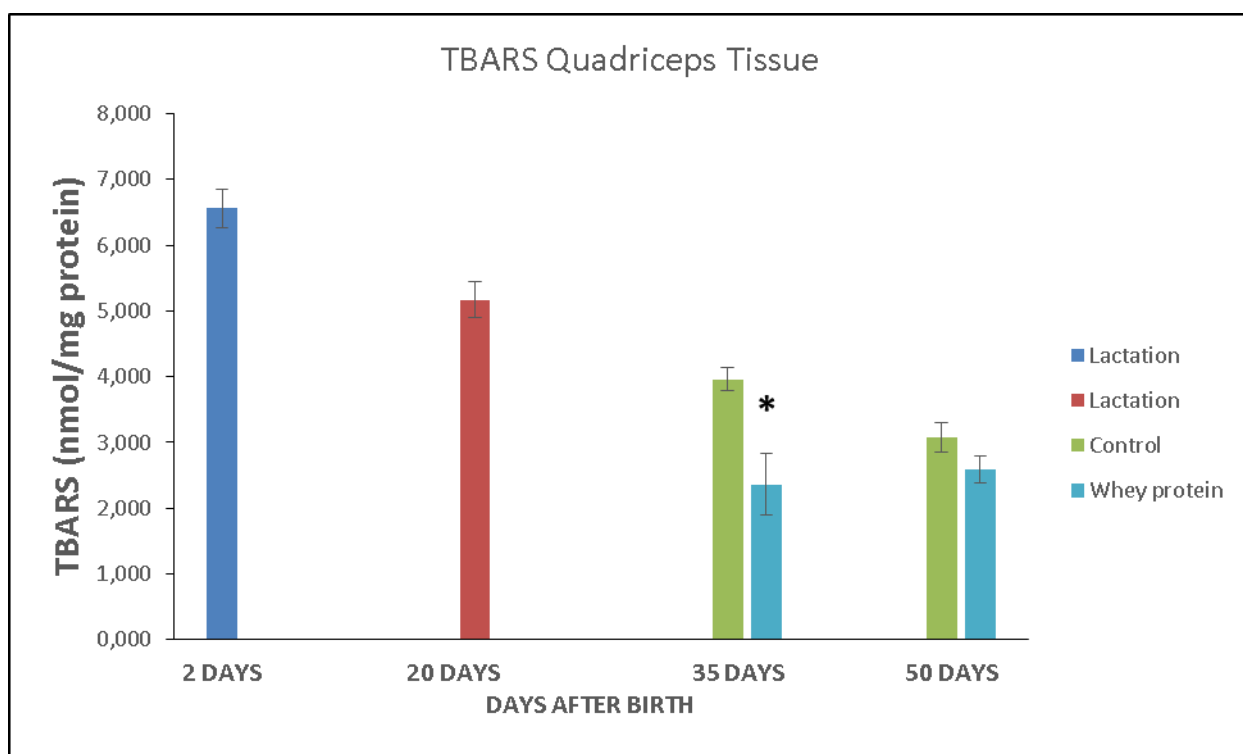
A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (48,22%) ( $p < 0,05$ )** της δραστικότητας της καταλάσης στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική αύξηση (62,03%)** (**p<0,05**) στα επίπεδα της CAT στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

**Πίνακας 15:** Επίπεδα καταλάσης στον τετρακέφαλο ιστό στην ομάδα control και whey.

<b>CAT Protein)</b> M.O. ± SEM (U/mg	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	38,849 ± 8,217	21,354 ± 3,362
whey	20,115 ± 3,613 <b>p&lt;0,05</b>	34,601 ± 2,886 <b>p&lt;0,05</b>

#### 4.2.8 Επίπεδα των TBARS στον τετρακέφαλο ιστό



**Διάγραμμα 18.** Επίπεδα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) στον τετρακέφαλο ιστό

• Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα 35 και 50 ημερών.

• Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

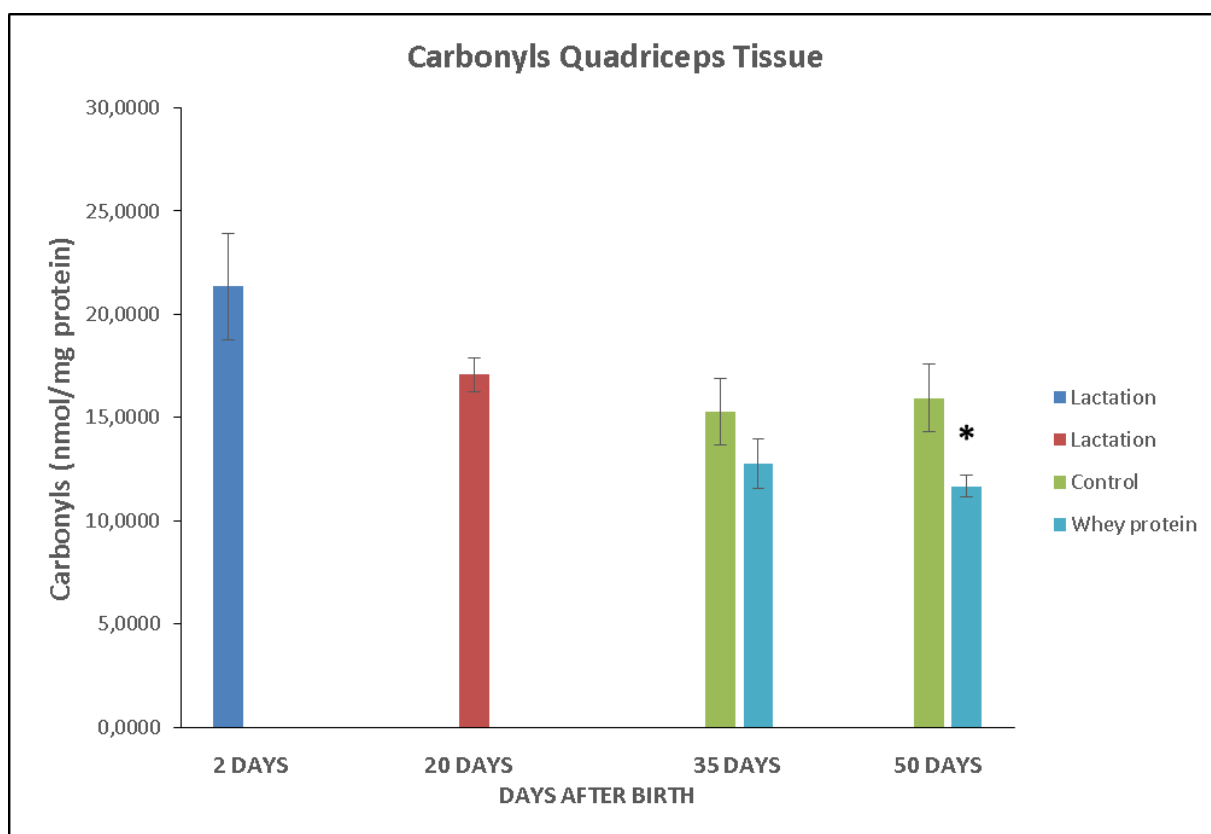
A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (40,44%)** στα επίπεδα των TBARS στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

**Πίνακας 16 :** Επίπεδα TBARS στον τετρακέφαλο ιστό στην ομάδα control και whey.

<b>TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	3,961± 0,175	3,074± 0,229
Whey	2,359± 0,470 <b>p&lt;0,05</b>	2,587± 0,203

#### 4.2.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό



**Διάγραμμα 19.** Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον τετρακέφαλο ιστό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των CARB στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των CARB στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

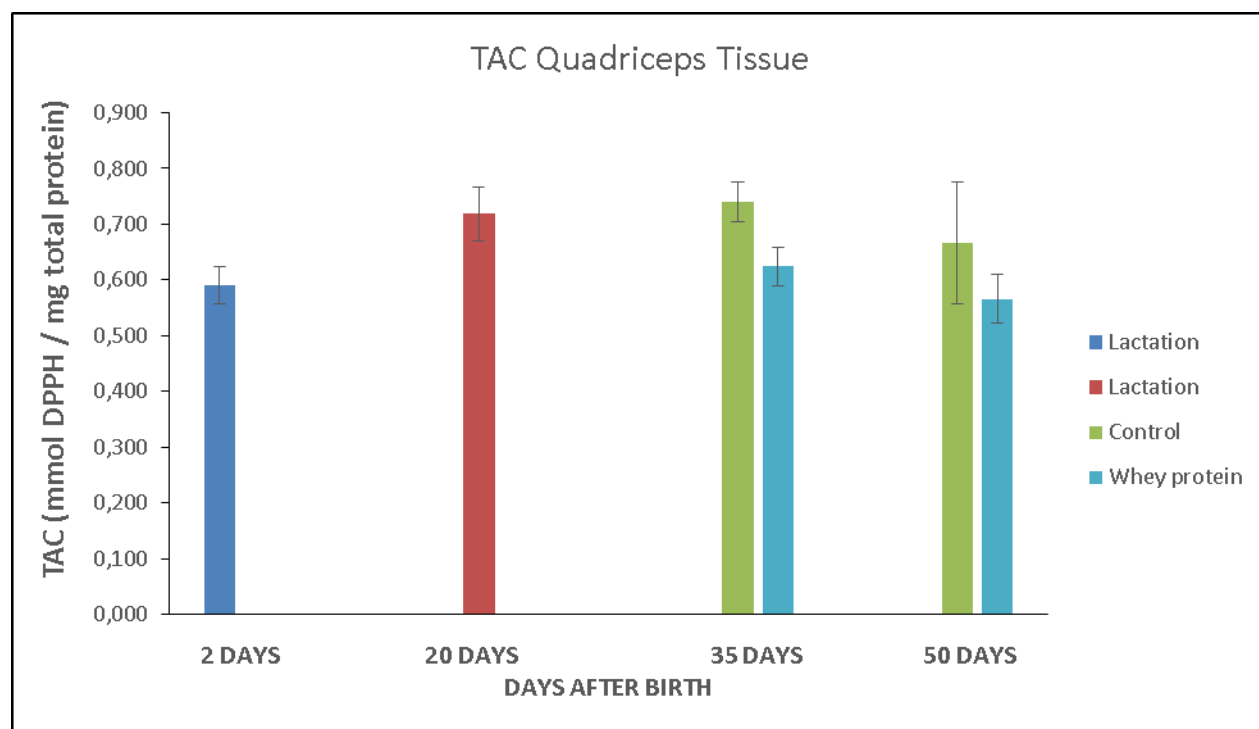
A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (26,88%) (0,05)** των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

**Πίνακας 17:** Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο τετρακέφαλο ιστό στην ομάδα control και whey

<b>CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	15,288 ± 1,632	15,956 ± 1,617
Whey	12,761 ± 1,214	11,667 ± 0,535

#### 4.2.10 Επίπεδα της TAC στον τετρακέφαλο ιστό



**Διάγραμμα 20.** Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον τετρακέφαλο ιστό



•Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

•Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

• Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TAC ανάμεσα στις ομάδες.

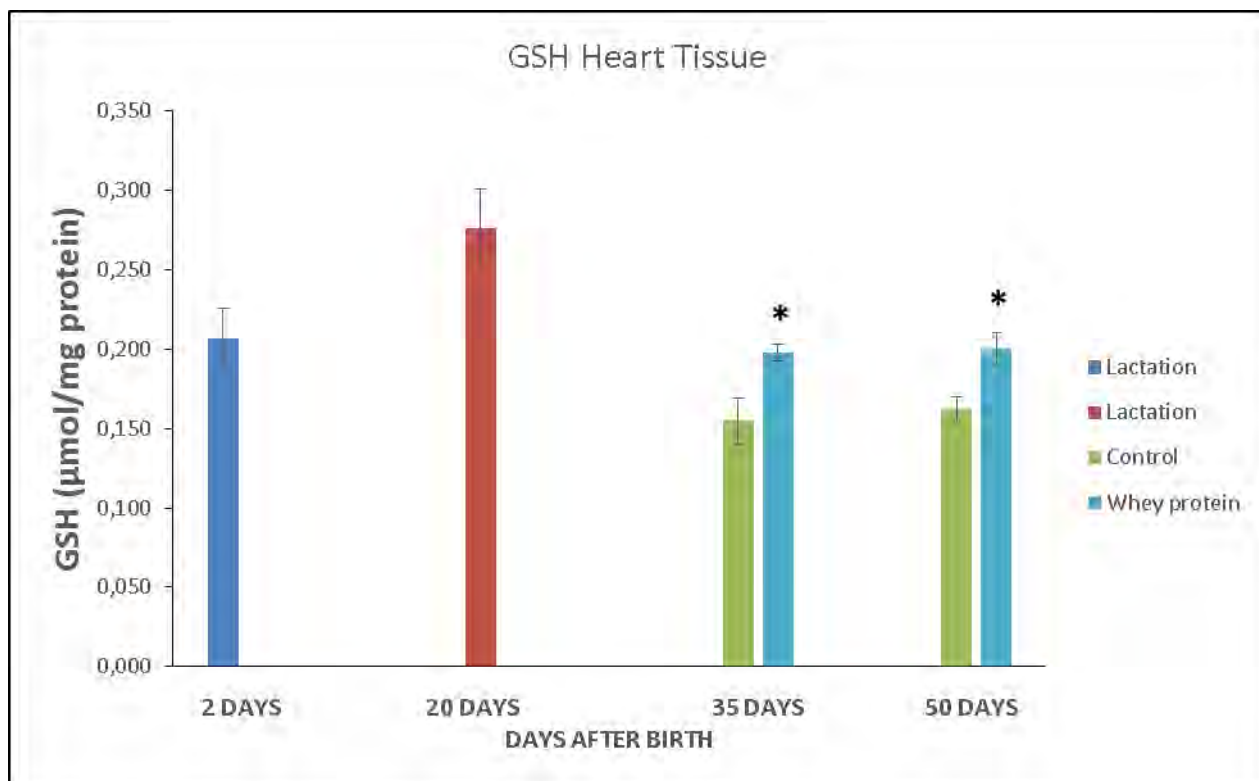
B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TAC ανάμεσα στις ομάδες.

**Πίνακας 18:** Επίπεδα της TAC στο τετρακέφαλο στην ομάδα control και whey

<b>TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	0,740 ± 0,035	0,667± 0,110
whey	0,624 ± 0,034	0,566 ± 0,043

## Καρδιακός Ιστός

### 4.2.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον καρδιακό ιστό



**Διάγραμμα 21.** Επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στον καρδιακό ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της GSH στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της GSH στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

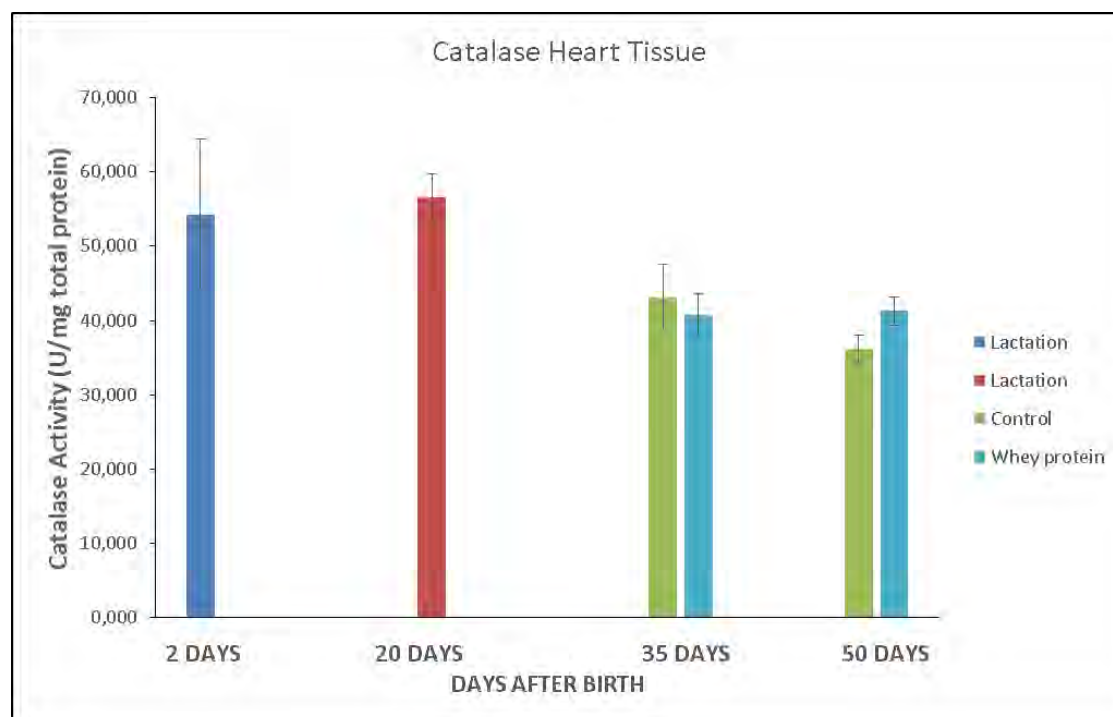
A. Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική αύξηση (27,74%)** ( $p < 0,05$ ) των επιπέδων της GSH ανάμεσα στις ομάδες.

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική αύξηση (23,45%)** ( $p < 0,05$ ) των επιπέδων της GSH ανάμεσα στις ομάδες.

**Πίνακας 19:** Επίπεδα γλουταθειόνης στον καρδιακό ιστό στην ομάδα control και whey

<b>GSH (<math>\mu\text{mol}/\text{mg protein}</math>) M.O. <math>\pm</math> SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	0,155 $\pm$ 0,015	0,162 $\pm$ 0,008
whey	0,198 $\pm$ 0,005	0,200 $\pm$ 0,010

#### 4.2.12 Επίπεδα Καταλάσης στον καρδιακό ιστό



**Διάγραμμα 22.** Επίπεδα δραστικότητας της καταλάσης (CAT) στον καρδιακό ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της CAT στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της CAT στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

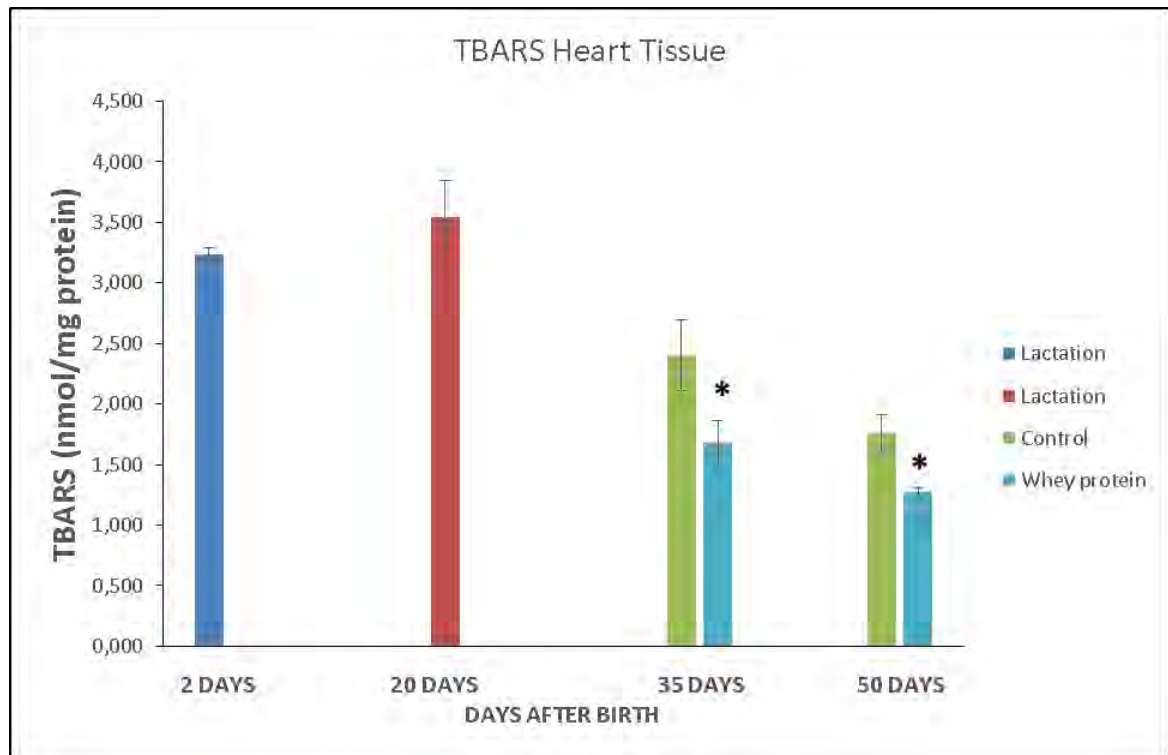
A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά

B. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της καταλάσης ανάμεσα στις ομάδες.

**Πίνακας 20:** Επίπεδα καταλάσης στον καρδιακό ιστό στην ομάδα control, και whey

CAT (U/mg Protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	43,137 ± 4,391	36,163 ± 1,798
Whey	40,743 ± 2,795	41,272 ± 1,945

#### 4.2.13 Επίπεδα των TBARS στον καρδιακό ιστό



**Διάγραμμα 23.** Επίπεδα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) στον καρδιακό ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των TBARS στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

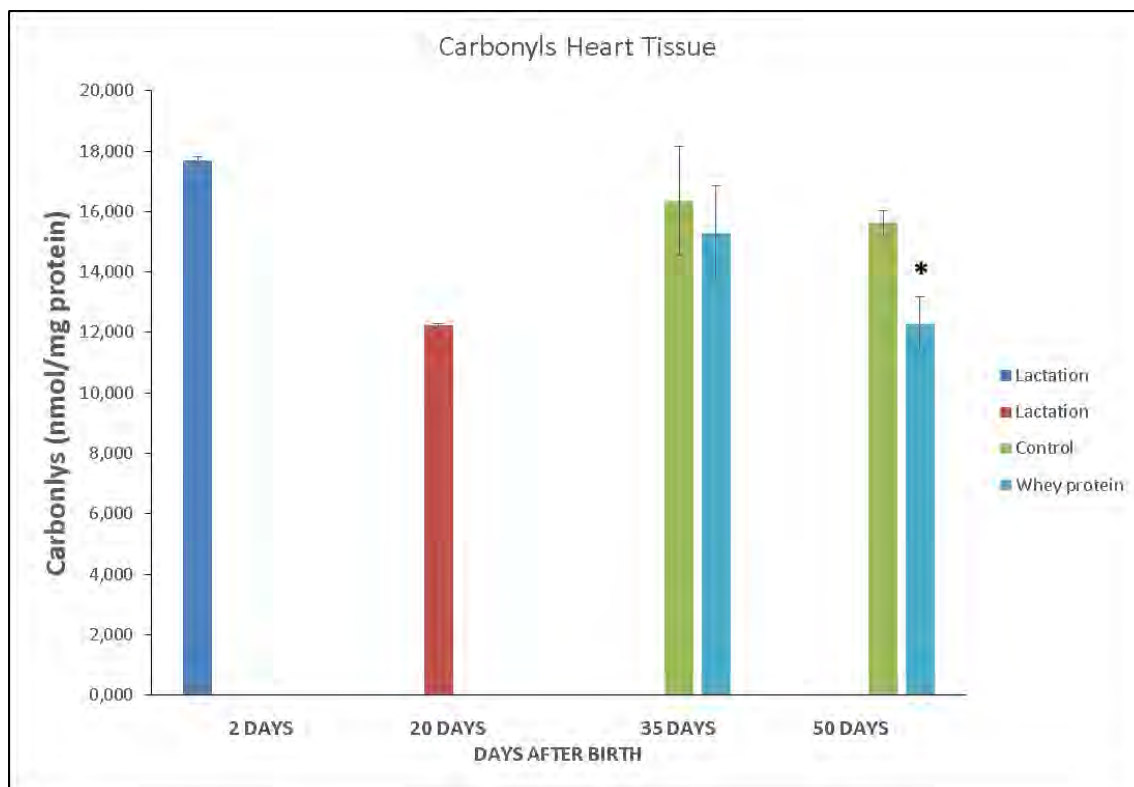
A) Στις 35 ημέρες παρατηρείται **στατιστικά σημαντική μείωση (30,25%) (p<0,05)** στα επίπεδα των TBARS .

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (27,81%) (p<0,05)** στα επίπεδα των TBARS στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

**Πίνακας 21:** Επίπεδα TBARS στον καρδιακό ιστό στην ομάδα control και whey

<b>TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	2,403± 0,290	1,758± 0,154
Whey	1,676± 0,185 <b>p&lt;0,05</b>	1,269± 0,035 <b>p&lt;0,05</b>

#### 4.2.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό



**Διάγραμμα 24.** Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των CARB στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων των CARB στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

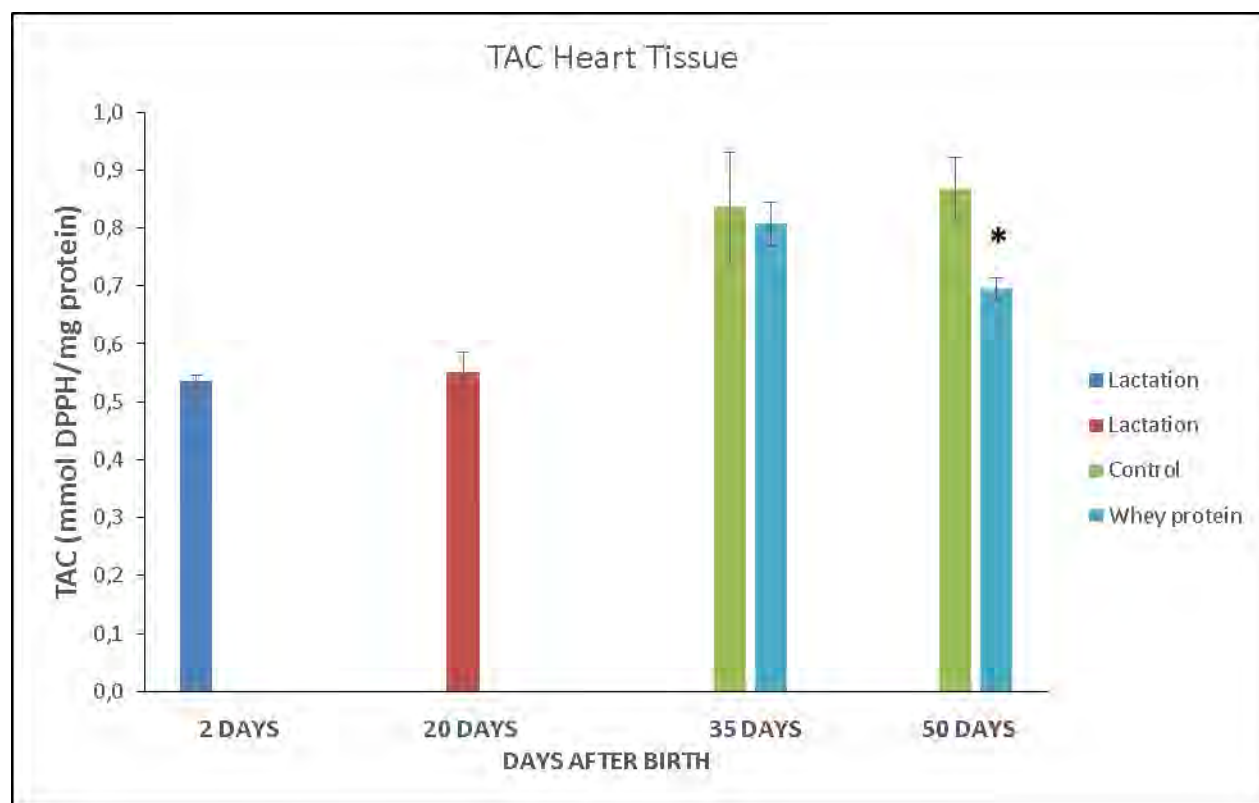
A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (21,52%)** ( $p<0,05$ ) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

**Πίνακας 22:** Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό ιστό στην ομάδα control και whey

<b>CARB (nmol/mg protein)</b> <b>M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	16,355± 1,800	15,627± 0,406
Whey	15,292± 1,544	12,263± 0,876
		<b>p&lt;0,05</b>

#### 4.2.15 Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό





**Διάγραμμα 25.** Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον καρδιακό ιστό

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων της TAC στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση μεταξύ των ομάδων control και whey

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι:

A. Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της TAC ανάμεσα στις ομάδες.

B. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε **στατιστικά σημαντική μείωση (19,81%) ( $p < 0,05$ )** της TAC στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

**Πίνακας 23:** Επίπεδα της TAC στον καρδιακό ιστό στην ομάδα control, grape pomace και whey

<b>TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM</b>	<b>35 ημέρες</b>	<b>50 ημέρες</b>
Control	0,836 ± 0,095	0,868 ± 0,053
whey	0,807 ± 0,038	0,696 ± 0,019 <b>p&lt;0,05</b>

4.4 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και στους ιστούς (τετρακέφαλος, καρδιά) των χοιριδίων

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα

	ΑΙΜΑ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
<b>Control</b>					
<b>Whey</b>	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS	35 DAYS: <b>-30,62%</b> 50 DAYS: NS	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS	35 DAYS: - <b>28,85%</b> 50 DAYS: - <b>21,14%</b>	35 DAYS: <b>-12,82%</b> 50 DAYS: NS

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στον τετρακέφαλο.

	ΜΥΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ-ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
<b>Control</b>					
<b>Whey</b>	35 DAYS: <b>+34,54%</b> 50 DAYS: NS	35 DAYS: - <b>48,22%</b> 50 DAYS: 62,03%	35 DAYS: - <b>40,44%</b> 50 DAYS: NS	35 DAYS: NS 50 DAYS: - <b>26,88%</b>	35 DAYS: NS 50 DAYS: NS

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών στην καρδιά

	ΚΑΡΔΙΑΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
<b>Control</b>					
<b>Whey</b>	35 DAYS: <b>+27,74%</b>  50 DAYS: <b>+23,45%</b>	35 DAYS: NS  50 DAYS: NS	35 DAYS: - <b>30,25%</b>  50 DAYS: - <b>27,81%</b>	35 DAYS: NS  50 DAYS: - <b>21,52%</b>	35 DAYS: NS  50 DAYS: - <b>19,81%</b>

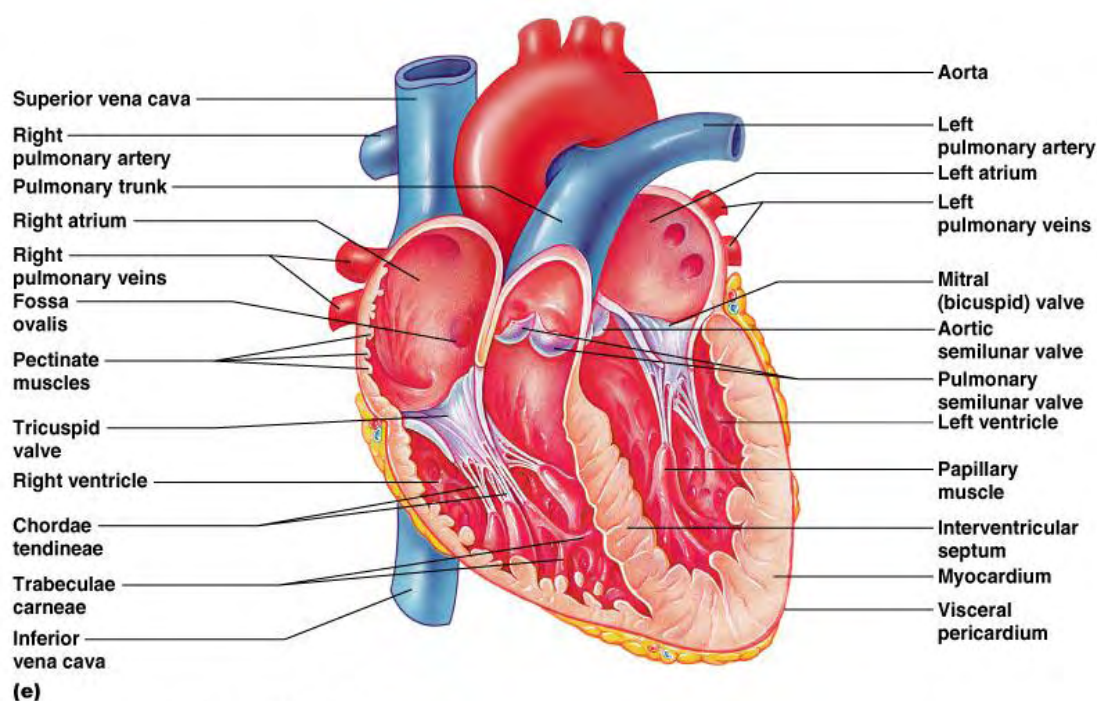
## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, τα οποία ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν εκτρέφονταν με διαφορετικό σιτηρέσιο. Από τη μία πλευρά, είχαμε την ομάδα ελέγχου, δηλαδή χοιρίδια τα οποία τρέφονταν με το βασικό σιτηρέσιο και από την άλλη πλευρά την ομάδα whey, δηλαδή χοιρίδια τα οποία τρέφονταν με σιτηρέσιο που περιλάμβανε πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν είκοσι οκτώ (28) χοιρίδια, στα οποία έγιναν τέσσερις (4) ιστοληψίες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξής τους, δηλαδή, στις δύο (2), είκοσι (20), τριάντα πέντε (35) και πενήντα (50) ημέρες μετά τη γέννησή τους. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι και τις είκοσι (20) ημέρες από τη γέννησή τους, τα χοιρίδια τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Από εκείνη την ημέρα και μέχρι την τριακοστή πέμπτη (35) ημέρα, τρέφονταν τόσο με το μητρικό γάλα όσο και με το πειραματικό σιτηρέσιο απογαλακτισμού. Τέλος, ο πλήρης απογαλακτισμός πραγματοποιήθηκε από την τριακοστή πέμπτη (35) μέρα μέχρι και την πενηκοστή (50) μέρα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών οξειδωτικού στρες στον τετρακέφαλο, στην καρδιά, στο πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των νεαρών χοιριδίων, που ήταν και ο μείζων λόγος της συγκεκριμένης έρευνας. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Κατά συνέπεια, δόθηκε η ευκαιρία για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των χοιριδίων σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, μέσω της σύγκρισης των τιμών των προαναφερθέντων δεικτών είτε μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας whey είτε ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο προσδιορισμός των δεικτών του οξειδωτικού στρες διεξήχθη στην καρδιά και στον τετρακέφαλο, όργανα τα οποία είναι ζωτικής σημασίας. Συγκεκριμένα, η καρδιά των γουρουνιών είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του ανθρώπου, αλλά παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά. Είναι ένα κοίλο, μυώδες όργανο, που αποτελείται από τους δύο κόλπους και τις δύο κοιλίες, που επικοινωνούν μεταξύ τους με τα κολποκοιλιακά στόμια. Ο φυσιολογικός της

ρόλος είναι η κυκλοφορία του αίματος. Πιο συγκεκριμένα, οξυγονωμένο αίμα (εμπλουτισμένο σε οξυγόνο) στέλνεται από την αριστερή κοιλία της καρδιάς με την αορτή και τις διακλαδώσεις της στα διάφορα όργανα του σώματος. Με τις μεγάλες φλέβες (πρόσθια/οπίσθια κοίλη φλέβα) το αίμα επιστρέφει στο δεξιό κόλπο. Στην συνέχεια, μέσω της δεξιά κοιλίας, το αίμα στέλνεται με την πνευμονική αρτηρία στους πνεύμονες για οξυγόνωση. Τέλος, το αίμα με τις πνευμονικές φλέβες φτάνει στον αριστερό κόλπο και από εκεί στην αριστερή κοιλία.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Όσον αφορά τον τετρακέφαλο ιστό, διαθέτει αρκετά ενδογενή αντιοξειδωτικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται: η τοκοφερόλη, διπεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη (καρνοσίνη, ανσερίνη), αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση. Παρά την παρουσία αντιοξειδωτικών συστημάτων, η οξείδωση των λιπιδίων στους μυς εμπλέκεται στη μοριακή βάση ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT), η ολική αντιοξειδωτική

ικανότητα (TAC- Total antioxidant capacity), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS- Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Οι δείκτες αυτοί μελετήθηκαν καθώς 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 προσλαμβάνομενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz et.al.1964) (Hughes et.al. 1989), και ρυθμίζει τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή (Clementi et.al. 1999). Επίσης, επιδρά σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις όπως η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, η πρωτεϊνοσύνθεση, 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 στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας λοιπόν, όσον αφορά τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), τα επίπεδά της βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control (35,45% στις 35 ημέρες) στον τετρακέφαλο και (27,74% και 23,45% στις 35 και 50 ημέρες) στον καρδιακό ιστό. Στο αίμα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές της GSH ανάμεσα στις ομάδες control και whey. Επιδράσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη GSH, μπορεί πιθανόν να εξηγηθούν μέσω της διαφοροποίησης των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση GSH όπως τη λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και τη GSH συνθετάση (Aquilano et al., 2014). Η ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων αυτών διαμεσολαβείται μέσω του στοιχείου απόκρισης σε αντιοξειδωτικά (ARE), μια cis αλληλουχία ενισχυτή που ρυθμίζει την μεταγραφή διαφόρων αντιοξειδωτικών γονιδίων (Kumar et al., 2014). Επιπροσθέτως οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και μεθειονίνη, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα GSH στον τετρακέφαλο και στην

καρδιά αφού έχει αποδειχθεί ότι η κυστεΐνη μετατρέπεται ενδοκυτταρικά σε GSH, ενισχύοντας κατά αυτό τον τρόπο την αντιοξειδωτική άμυνα (Marshall 2004).

Όσον αφορά την αξιολόγηση από τις μετρήσεις για τη δραστικότητα της **καταλάσης**, στο αίμα των χοίρων της ομάδας whey παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 30,62% στις 35 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, στον τετρακέφαλο ιστό βρέθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση κατά 48,22% στις 35 ημέρες ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 62,03%. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες μετρήσεις που έγινες στην καρδιά δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της καταλάσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν στο αίμα, όπου παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της CAT, η πιο λογική εξήγηση είναι ότι άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι σε αυξημένα επίπεδα στο αίμα των χοίρων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τόσο μεγάλη ανάγκη σε καταλάση. Όσον αφορά στην μείωση της δραστικότητας της καταλάσης στον τετρακέφαλο των 35 ημερών στους χοίρους της ομάδας whey σε σχέση με τους χοίρους της ομάδας control, η πιο λογική εξήγηση είναι ότι άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι σε αυξημένα επίπεδα (όπως φάνηκε με την γλουταθειόνη) με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τόσο μεγάλη ανάγκη σε καταλάση. Το σύστημα της καταλάσης όπως και το σύστημα της GSH εμπλέκονται στην εξουδετέρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Η καταλάση δρα απευθείας ενώ η GSH δρα μέσω του ενζύμου GPx (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) στην εξουδετέρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, με το οποίο η GSH οξειδώνεται σε GSSG και στην συνέχεια η GSSG ανάγεται μέσω του ενζύμου GR (ρεδουκτάση της γλουταθειόνης) σε GSH. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η whey protein επάγει την σύνθεση της Gpx (Kerasioti *et al.*, 2013) Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στον τετρακέφαλο στις 35 ημέρες, όπου η GSH είναι σε αυξημένα επίπεδα, η καταλάση να βρίσκεται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη και να λειτουργεί κυρίως ο μηχανισμός της GSH ενώ στις 50 η CAT αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά με αποτέλεσμα να λειτουργεί κυρίως ο μηχανισμός της σε σχέση με τον μηχανισμό της GSH.

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

κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο. Τα αποτελέσματα για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity) δείχνουν ότι στους χοίρους της ομάδας whey υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στον καρδιακό ιστό κατά 19,81% στις 35 ημέρες. Στον τετρακέφαλο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, ενώ στο αίμα παρατηρήθηκε μείωση κατά 12,82% στους χοίρους της ομάδας whey σε σχέση με τους χοίρους της ομάδας control. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις, οι τιμές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Από τα αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στους χοίρους παρατηρείται ότι οι μεταβολές στα επίπεδα της TAC είναι εξαρτώμενες από τον ιστό καθώς κάθε ιστός που προέρχεται από ζωτικό όργανο διαφέρει σε περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Σε κάποιους ιστούς παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα της TAC και αυτό μπορεί να οφείλεται στην άμεση δράση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος που ενεργοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς που εμποδίζουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών.

Η **υπεροξείδωση λιπιδίων** αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και μπορεί να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν την ποσοτικοποίηση είτε των πρωτογενών (υδροϋπεροξειδίων), είτε των δευτερογενών (TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και F2-ισοπροστάνια) προϊόντων της υπεροξείδωσης. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους χοίρους παρατηρείται ότι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) δείχνουν πως ο συγκεκριμένος δείκτης, στους χοίρους της ομάδας whey σε σχέση με τους χοίρους της ομάδας control, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση τόσο στην καρδιά (30,25 % στις 35 ημέρες και 27,81 % στις 50 ημέρες) όσο και στον τετρακέφαλο (40,44% στις 50 ημέρες). Κάτι τέτοιο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα επίπεδα της GSH όσον αφορά στην καρδιά είναι αυξημένα τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες, ενώ στον τετρακέφαλο η GSH αυξάνεται στις 35 ημέρες και στην συνέχεια δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά στις 50 ημέρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας τους κρέατος,



καθώς και στην παραγωγή διάφορων τοξικών ενώσεων (Rey et al., 2001). Ειδικότερα, η οξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στην αλλοίωση της γεύσης και τη μείωση της διατροφικής αξίας του κρέατος και των προϊόντων του (Namand Ahn, 2003). Έτσι, η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων εκτός από τις θετικές επιδράσεις για την υγεία του ζώου, θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του κρέατος (Arshad et al., 2013).

Οι μετρήσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υποδηλώνουν το ποσοστό οξειδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών, από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Από σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (26,88% και 21,52% στις 50 ημέρες) στον τετρακέφαλο και στην καρδιά, αντίστοιχα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στον τετρακέφαλο η αύξηση της CAT στις 50 ημέρες παρείχε προστασία από την οξειδωση των πρωτεϊνών ενώ στη καρδιά οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων του αντιοξειδωτικού μορίου GSH. Στο αίμα, από την σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ( $p < 0,05$ ), στα ζώα 35 και 50 ημερών κατά 28,85% και 21,14% αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν μια μη αναστρέψιμη μορφή τροποποίησης πρωτεϊνών που έχει αποδεχθεί πως είναι πολύ σταθερές, σε αντίθεση με τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που εξουδετερώνονται μέσα σε λίγα λεπτά. Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, χωρίς να είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένης δράσης οξειδωτικού και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως δείκτης συνολικής οξειδωσης των πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα που σχηματίζονται με την οξειδωση των πρωτεϊνών (φορμαλδεΰδη, ακεταλδεΰδη, ακετόνη) απομακρύνονται γρήγορα και είναι δύσκολο να προσδιοριστούν. Γι' αυτό και στην περίπτωσή μας δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Γενικώς, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωση των πρωτεϊνών από τις ROS συντελεί στην απώλεια των απαραίτητων αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη) και επηρεάζει την ικανότητα συγκράτησης του νερού από τις πρωτεΐνες του κρέατος, το χρώμα και την υφή των επεξεργασμένων προϊόντων του κρέατος, γεγονός που οδηγεί στην μείωση της θρεπτικής τους αξίας (Villaverde et al., 2014; Lund et al., 2011).

Αξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι στο διάστημα από τις 2 ημέρες έως τις 20 ημέρες παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων

ενώ τα επίπεδα GSH, CAT και TAC είναι μειωμένα. Υπενθυμίζεται ότι κατά το συγκεκριμένο διάστημα τρέφονταν μόνο με μητρικό γάλα. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η ηλικία των χοίρων τόσο μεγαλύτερη είναι και η επιβάρυνση που υφίστανται από το οξειδωτικό στρες, για αυτό και βλέπουμε τις μεταβολές στους παραπάνω δείκτες, οι οποίοι επάγονται λόγω απόκρισης στο οξειδωτικό στρες. Αυτό τονίζει τη σημασία της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με αντιοξειδωτικές ουσίες ιδιαίτερα στους χοίρους νεαρής ηλικίας. Επίσης, ήταν ιδιαίτερα σημαντικό ότι και ο ρυθμός αύξησης του βάρους των ζώων ήταν μεγαλύτερος στα ζώα που έλαβαν την πειραματική ζωοτροφή σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Αυτό δείχνει ότι η ζωοτροφή που ήταν εμπλουτισμένη με πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτιώνει όχι μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα των χοίρων αλλά και την παραγωγικότητά τους.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα πτυχιακή εργασία καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή των παραγόμενων βιολειτουργικών ζωοτροφών, δηλαδή του σιτηρέσιου που είναι εμπλουτισμένο με πρωτεΐνη τυρογάλακτος, στην καθημερινή διατροφή των χοίρων κατά την περίοδο του απογαλακτισμού τους, ενδέχεται να βελτιώσει την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος και των ιστών και μπορεί να παρέχει προστασία έναντι των ασθενειών που τα προσβάλλουν. Αυτή η ευεργετική επίδραση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος πιθανότατα βασίζεται στην υψηλή περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε β-λακτογλοβουλίνη (β-Lg), α-λακταλβουμίνη (α-La), Αλβουμίνη πλάσματος (BSA) και Ανοσοσφαιρίνες (Ig). 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. Αυτό συμβαίνει, διότι οι συγκεκριμένες ζωοτροφές αποδείχτηκε ότι μειώνουν την οξειδωτική βλάβη των βιολογικών μορίων (δηλαδή την υπεροξείδωση των λιπιδίων, και των πρωτεϊνών) και ότι αυξάνουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (η δραστηριότητα της καταλάσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης). Ωστόσο, οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις θα πρέπει να συνεκτιμηθούν με το γεγονός ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες. Ένα πρόβλημα επίσης αποτελεί το κόστος της πρωτεΐνης ορού γάλακτος που ίσως να αποτελέσει πρόβλημα για τη χρήση της ως συμπλήρωμα στις ζωοτροφές, όμως ίσως να μπορέσει χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα στην ανθρώπινη διατροφή.

Εν κατακλείδι, το συγκεκριμένο σιτηρέσιο με πρωτεΐνη τυρογάλακτος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα και σε άλλα οικότροφα ζώα. Ο ρόλος του θα ήταν διπλός, καθώς έτσι θα αποφεύγονται και τα οικολογικά πρόβλημα που προκαλούνται από την εναπόθεση των υποπροϊόντων της τυροκομίας στο περιβάλλον.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aebi M, et al. (1984) Structure and function of the TRP3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of transcription, promoter sequence, and sequence coding for a glutamine amidotransferase. *Curr Genet* 8(3):165-72

Agarwal A, Gupta S, Sikka S (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*, 18: 325-332

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

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis A.M, Kouretas D (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts *Food and Chemical Toxicology*. 61: 60–68

Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.196.

Arshad, M.S. et al., 2013. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with alpha-lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in health and disease*, 12, p.164.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.

BERGENDI L, BENES L, DURACKOVA Z, FERENCIK M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999, 65:1865–1874

Bielski BH, Richter HW, Chan PC: Some properties of the ascorbate free radical. *Ann N Y Acad Sci* 258:231–237, 1975

Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase. *Catalase Structural Tutorial Text*.

Bouchard L, Blais S, Desrosiers C, Zhao X, Lacasse P (1999) Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *Journal of Dairy Science* 82: 2574–2581

BUETTNER GR. The pecking order of free-radicals and antioxidants – Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300:535–543

Caccavo D (2002). Review: Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *Journal of Endotoxin Research*, 8 (6): 403-417

Campbell J. M, Crenshaw J. D. & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, Volume 4:19

Carrillo, M., S. Zanuy, F. Prat, J. Cerdà, J. Ramos, E. Mañanos, and N.R. Bromage. – 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (eds.): *Broodstock management and egg and larval quality*, pp. 138-168. Blackwell Science Ltd., Oxford, London.

Celi P (2010). The role of oxidative stress in small ruminants health and production, *R. Bras. Zootec.*, v.39: 348-363

Chang J, et al. (2012) Structure-function analysis and genetic interactions of the yeast branchpoint binding protein Msl5. *Nucleic Acids Res* 40(10):4539-52

Chelikani P1, Fita I, Loewen PC.(2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jan;61(2):192-208.

Chen, Y.P., Chen, X., Zhang, H., Zhou, Y.M., 2013. Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. *Br. Poult. Sci.* 54 (4), 531–537

Clementi, Emilio; Smith, Guy Charles; Howden, Martin; Dietrich, Salvador; Bugg, S; O'Connell, MJ; Goldsbrough, PB; Cobbett, CS (1999). «Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*». *The Plant cell* 11 (6): 1153–64.

Commoner B, Townsend J, Page GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954; 174: 689-691.

Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Harris P.A, Roberts C.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004a). Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 65, 80–87.

Deaton C.M, Marlin D.J, Smith N.C, Roberts C.A, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2005). Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Veterinary Journal* 37, 243–249.

DeLeve, L.D., Kaplowitz, N., 1990. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.* 10 (4), 251–266

Dhanappriya R, Magesh H, Deccaraman M, Anbarasu K, Rajeswary H (2014) Whey Powder: A Potential Anti-diarrheal Agent Through its Biofilm Formation Pakistan Journal of Biological Sciences, 17(2): 220-226

Earl R. Stadtman, Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases, 25 JAN 2006

EDGE R, McGARVEY DJ, TRUSCOTT TG. The carotenoids as antioxidants.A review. J Photochem Photobiol B 1997, 41:189–200

FANG YZ, YANG S, WU GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 2002, 18:872–879

Fang YZ. Free radicals and nutrition. In: Fang YZ, Zheng RL, eds. Theory and application of free radical biology. Beijing: Scientific Press, 2002;647

Gerasopoulos K, Stagos D, Kokkas S, Petrotos K, Kantas D, Goulas P, Kouretas D. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. Food Chem Toxicol. 2015 Aug;82:42-9

Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Krouezas A, Gkika H, Barda C, Kokkas S, Stamati E, Goulas P, Kouretas D. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. Food Chem Toxicol. 2015

Gerogianni, I., Gourgoulisanis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. Archives of Hellenic Medicine. 23(5), pp.444–454.

Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Tsatsakis A.M, Hayes A.W, Kouretas D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. Human and Experimental Toxicology. 33(11):1099-112

Goutzourelas N, Stagos D, Housmekeridou A, Karapouliou C, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells.

Guimaraes, A. K. V. ; Camarão, A. P. ; Filho, J. A. R., 2010. Botanical composition of diet selected by cattle in cultivated pastures and consorted with legumes, established with and without burning of secondary vegetation. Agrarian, 2 (6): 125-133

Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995 41(12 Pt 2):1819-28.

Halliwell B (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease, National University of Singapore

Halliwell B, Gutteridge J.M.C (1989) Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 2. Clarendon Press, Oxford

Halliwell B, Gutteridge J.M.C (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.* 186:1-85

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.C (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Ed, Oxford University Press, Oxford

HUGHES, R.E., 1964. REDUCTION OF DEHYDROASCORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES. *Nature*, 203, pp.1068–1069.

Hughes, RE (1964). «Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues». *Nature* 203 (4949): 1068–9

Hussain, F. and G. Mustafa. 1995. Ecological studies on some pasture plants in relation to animal used found in Nasirabad valley, Hunza, Pakistan. *Pak. J. Pl. Sci.*, 1:263-272

*Int J Mol Med.* 2015 Aug;36(2):433-41. doi: 10.3892/ijmm.2015.2246. Epub 2015 Jun 15

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), pp.233–238.

Janaszewska A and Bartosz G (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 62: 231-6

Kaplan M1, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr.* 2001 Aug;131(8):2082-

Keles M.S, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akçay F (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J NeurolSci.* 28:141-3

Kerasioti E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis A.M, Koutedakis Y, Stagos D, Kouretas D, Karathanos V (2012). Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem. Toxicol.* 50(8): 2805–2810

Kerasioti E, Stagos D, Jamurtas A, Kiskini A, Koutedakis Y, Goutzourelas N, Pournaras S, Aristidis M, Tsatsakis A.M, Kouretas D (2013). Anti-inflammatory effects of a special

carbohydrate–whey protein cake after exhaustive cycling in humans. *Food and Chemical Toxicology*. 61: 42–46

KOJODA G, HARRISON DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999, 43:562–567

Kosikowski (1979) Whey utilization and whey produces. *Journal of dairy science* 62: 1149-1160

Kumar, H. et al., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural product reports*, 31(1), pp.109–139.

Kumar, H., Kim, I.S., More, S.V., Kim, B.W., Choi, D.K., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.* 31 (1), 109–139.

Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 653-661.

Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Friis, C (2003). Evaluation of a single dose versus divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Research in Veterinary Science* 74, 271–277

Lund, M.N. et al., 2011. Protein oxidation in muscle foods: a review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.83–95.

Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173(3):502-11

Marshall K (2004). Therapeutic Applications of Whey. *Alternative Medicine Review*. 9 (2): 136-156

Maton, Anthea; Jean Hopkins, Charles William McLaughlin, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993). *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.



McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652

Micke P, Beeh KM, Buhl R. Effects of long-term 50. supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Nutr* 2002;41:12-18.

Micke P, Beeh KM, Schlaak JF, Buhl R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Clin Invest* 2001;31:171-178.

Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG. NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res* 2005; 97: 1055-1062.

MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95-108

Miller M.J, Zhang X.J, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, McIntyre J.A, Clark Nam, K.C. & Ahn, D.U., 2003. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat science*, 63(1), pp.1-8.

Neunteufl, T.; Kostner, K.; Katzenschlager, R.; Zehetgruber, M.; Maurer, G.; Weidinger, F. Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic OECD-FAO Agricultural Outlook 2008-2017

Ou, H., Simon, J.A., Rubel, E.W., and Raible, D.W. (2012). Screening for chemicals that affect hair cell death and survival in the zebrafish lateral line. *Hearing Research* 288(1-2): 58-66

Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P., 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews*, 29(2), pp.351-378.

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

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.

Raes K, Balcaen A, Dirinck P, De Winne A, Claeys E, Demeyer D, De Smet S (2003). Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. *Meat Science* 65: 1237–1246

Rey, A.I. et al., 2001. Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of animal science*, 79(5), pp.1201–1208.

RICHTER C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987, 44:175–189

Roland, F.B., Jr. and I.W. Sizer. 1952. A Spectrophotometric Method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase.

S. Toyokuni, N. Miyake, H. Hiai, M. Hagiwara, S. Kawakishi, T. Osawa, K. Uchida Saito K, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *J Agric Food Chem* 2003;51:3668–74.

Scholz, R.W. Graham K.S. Gumprich 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: 514–7.

Selvam R, Devaraj S. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione. *Indian J Biochem Biophys* 1996;33:62–5.

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.

Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res Int* 2007;40:15–21.

Smith K.L, Hogan J.S, Weiss W.P, (1997) Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 75:1659–1665

Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. (2009). *Animal Health Research Reviews*. 10:53-63. (A review of current thinking regarding oxidative stress in periparturient dairy cattle)

Urbaityte R, Mosenthin R, Eklund M (2009). The Concept of Standardized Ileal Amino Acid Digestibilities: Principles and Application in Feed Ingredients for Piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 22(8) : 1209 – 1223

Vainio et al (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 1999 Feb 4;397 (6718):405-9.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44–84

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160:1–40

Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*

van der Meulen J, Koopmans R. A, Dekker R. A. Hoogendoorn A (2010) Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. *The Animal Consortium*, Volume 4(10): 1653-1661.

Vaya J, Aviram M. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis.

Villaverde, A., Morcuende, D. & Estevez, M., 2014. Effect of curing agents on the oxidative and nitrosative damage to meat proteins during processing of fermented sausages. *Journal of food science*, 79(7), pp.C1331–42.

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: 32–37

Wessely-Szponder J, Bobowiec R, Martelli F, Wojcik M, Kosior-Korzecka U (2004) Assessment of neutrophil components as markers of lung injury in the course of bovine respiratory tract infections. *Polish Journal of Veterinary Science* 7: 157–161

WuCH, ChenHM, Shiao CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int* 2003;36:949–57

Yoshikawa, T.: A Guide to Free Radicals. Part2. Sentan Igaku Sha, Tokyo, 1998.

Yoshikawa, T.: Medicine of Free Radicals. Shindan to Chiryo Sha, Tokyo, 1997.

Yoshikawa, T.: Science of Free Radicals. Koudan Sha Saightifikkku, Tokyo, 1997.

Μάντης Α. (2000): Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του.

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

Σαράντης, Κ.Ν., 2010. Αποτελεσματικότητα εκμεταλλεύσεων ελεύθερης εκτροφής χοίρων.  
pp.19.