



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

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ, ΣΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΥ
ΚΡΕΑΤΟΣ.**

Αϊβαζίδης Στέφανος

Λάρισα 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους-συναδέλφους μου Νίκο Δεμερτζή και Αλέξανδρο Πρίφτη για τη βοήθεια και την υποστήριξη τους στο εργαστήριο καθώς και τη Θάλεια Κερασιώτη για την υπομονή και τη διάθεση της για να πετύχει η πειραματική διαδικασία

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη Οξυγόνου.....	8
1.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	10
1.2.1 Ενδογενείς πηγές:.....	10
1.2.2 Εξωγενείς πηγές :.....	10
1.3 Βιολογική Δράση Των Δραστικών Ειδών Οξυγόνου.....	11
1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις.....	11
1.3.3 Θετικές επιδράσεις.....	14
1.4 Οξειδωτικό στρες.....	15
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	17
1.5.1 Ένζυμα με Αντιοξειδωτική Δράση.....	18
1.5.1.α. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD).....	18
1.5.1.β. Καταλάση (CAT).....	18
1.5.1.γ. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GPX).....	18
1.5.1.δ. Αναγωγάση της Γλουταθειόνης (GR).....	19
1.5.2. Μακρομοριακές Ενώσεις χωρίς Ενζυμική Δράση.....	19
1.5.2.α. Γλουταθειόνη.....	19
1.5.2.β. Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C).....	20
1.5.2.γ. Ουρικό Οξύ.....	20
1.5.2.δ. Βιταμίνη E (α-Τοκοφερόλη).....	21
1.5.2.ε. Συνένζυμο Q-10 (Ουβικινόνη).....	21
1.5.2.στ. Καροτένια.....	21
1.5.2.ζ. Τρανσφερρίνη – Φερριτίνη.....	21
1.5.2.η. Σερουλοπλασμίνη.....	22
1.5.2.θ. Αλβουμίνη.....	22
1.6 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος.....	22
1.6.1 Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος.....	23
1.6.2 Βιολογικά συστατικά.....	24
1.6.2.α. Περιεχόμενο αμινοξέων.....	24
1.6.2.β. Λακτοφερρίνη.....	25
1.6.2.γ. Ανοσοσφαιρίνες.....	25
1.6.2.δ. β-Λακτοσφαιρίνη.....	25
1.6.2.ε. α-Λακταλβουμίνη.....	26
1.6.2.στ. Λακτοπεροξειδάση.....	26
1.6.2.ζ. Αλβουμίνη ορού βοδινού.....	26
1.6.2.η. Γλυκομακροπεπτίδια.....	27
1.6.3 Μηχανισμός δράσης.....	27
1.7 Πρωτεΐνη σόγιας.....	29
1.7.1 Συμπύκνωμα σόγιας: Παρασκευή και οφέλη.....	29
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	31
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
3.1 Υλικά.....	32
3.2 Μέθοδοι.....	32

3.2.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH [•]	32
3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{*+}	33
3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH [•]	35
3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου (O ₂ ^{•-}).....	35
3.2.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης	36
3.3 Στατιστική Ανάλυση.....	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
4.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH [•]	39
4.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS ^{*+}	40
4.3 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH [•]	41
4.4 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας (O ₂ ^{•-}).....	42
4.5 Αναγωγική Δύναμη	43
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	46
6.1 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH [•]	46
6.2 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{*+}	47
6.3 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH [•]	47
6.4 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου (O ₂ ^{•-}).....	48
6.5 Πρωτόκολλο εκτίμησης αναγωγικής δύναμης.....	48
7 Βιβλιογραφία.....	49

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Επιβλαβής δράση των ελευθέρων ριζών

Εικόνα 2: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Εικόνα 3: Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες

Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εικόνα 5: Ασθένειες και οξειδωτικό στρες

Εικόνα 6: Σύνθεση γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμινικό και γλυκίνη

Εικόνα 7: Τα ισοφλαβονοειδή γενινσταΐνη, δαιδζεΐνη και οιστραδιόλη

Εικόνα 8: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Εικόνα 9: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

Γράφημα 2: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

Γράφημα 3: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+} της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της

αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

Γράφημα 4: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

Γράφημα 5: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH• της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

Γράφημα 6: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

Γράφημα 7: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH• της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

Γράφημα 8: Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

Γράφημα 9: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

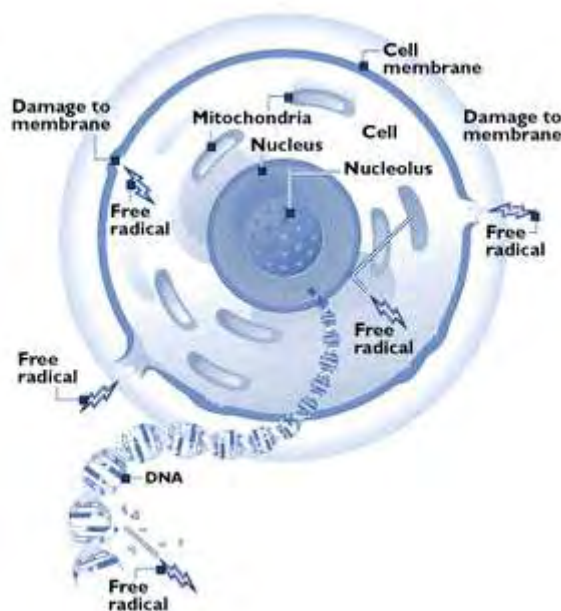
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών (κυρίως δραστικών ειδών οξυγόνου) και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού σε βάρος του δευτέρου σκέλους της ισορροπίας αυτής. Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και η υπεροξυλική ρίζα (RO_2^{\cdot}). Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) εμπλέκονται στην αιτιολογία πολλών ασθενειών όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνος, διαβήτης, καταρράκτης, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και γήρανση (Honda et al., 2004; Uchida, 2000). Ο οργανισμός έχει το δικό του σύστημα άμυνας απέναντι στα ROS και βασίζεται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα (π.χ SOD, CAT, GP_x) και σε ενδογενή αντιοξειδωτικά (π.χ γλουταθειόνη). Η ενίσχυση του αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού μέσω διατροφικών συμπληρωμάτων αποτελεί μια λογική και πρακτική προσέγγιση στην μείωση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αιγοπρόβειας και αγελαδινής πρωτεΐνης τυρογάλακτος, της πρωτεΐνης σόγιας και της πρωτεΐνης εκχυλίσματος βοδινού κρέατος. Πραγματοποιήθηκαν 5 μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των πρωτεϊνών: 1) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•], 2) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}, 3) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•], 4) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$, 5) Μέθοδος προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης. Βρέθηκε ότι και οι 4 πρωτεΐνες εμφάνισαν ανασταλτική δράση απέναντι στις ρίζες DPPH[•], ABTS^{•+} και OH[•] ενώ μόνο η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε ανασταλτική δράση απέναντι στη ρίζα $O_2^{\cdot-}$. Συγκεκριμένα, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών τόσο αυξανόταν η αντιοξειδωτική τους δράση. Ακόμη και οι 4 πρωτεΐνες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εμφάνισαν αυξανόμενη αναγωγική δύναμη. Η πρωτεΐνη με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ήταν η πρωτεΐνη βοδινού.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη Οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή μορίου που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Προκύπτει από την προσθήκη ή την απώλεια ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα (Mylonas and Kouretas, 1999). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου ($H\bullet$). Εξαιτίας αυτών των ελεύθερων ηλεκτρονίων οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και στις πρωτεΐνες.



Εικόνα 1: Επιβλαβής δράση των ελευθέρων ριζών

Αρκετές ελεύθερες ρίζες είναι ή προέρχονται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και από τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS).

Δραστικές μορφές οξυγόνου (π.χ. $OH\bullet$, $RO\bullet$, $ROO\bullet$, $ROOH\bullet$): Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει

με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al.,1993; Gutteridge, 1995). Στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, περιλαμβάνονται επίσης και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι τύποι οξυγόνου υψηλής δραστηριότητας και εμφανίζονται φυσιολογικά στον οργανισμό ως αποτέλεσμα βιοχημικών διεργασιών. Συναντώνται επίσης στο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα στους ρυπαντές της ατμόσφαιρας, στον καπνό του τσιγάρου, στο αλκοόλ, στα συντηρητικά και τα λιπάσματα, στις υπεριώδεις ακτίνες και στο όζον

Οι ενώσεις στις οποίες συμμετέχει το άζωτο λέγονται **δραστικές μορφές αζώτου** ($NO\cdot$, $NO_2\cdot$, $ONOO\cdot$) ενώ αυτές στις οποίες συμμετέχει το χλώριο λέγονται **δραστικές μορφές χλωρίου**.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Ρίζες</u>	<u>Μη ρίζες</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου ($OH\cdot$)	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου ($RO_2\cdot$)	Υποβρωμιώδες Οξύ $HOBr$
Ρίζα Αλκοξειδίου ($RO\cdot$)	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ($HO_2\cdot$)	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Ρίζες</u>	<u>Μη ρίζες</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ($NO\cdot$)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ($NO_2\cdot$)	Κατιόν Νιτροσουλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσουλίου (NO^-)

1.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Υπάρχουν ενδογενείς και άλλες εξωγενείς πηγές παραγωγής ROS.

1.2.1 Ενδογενείς πηγές:

(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο ανάγοντας το σε σουπεροξείδιο.

(β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.

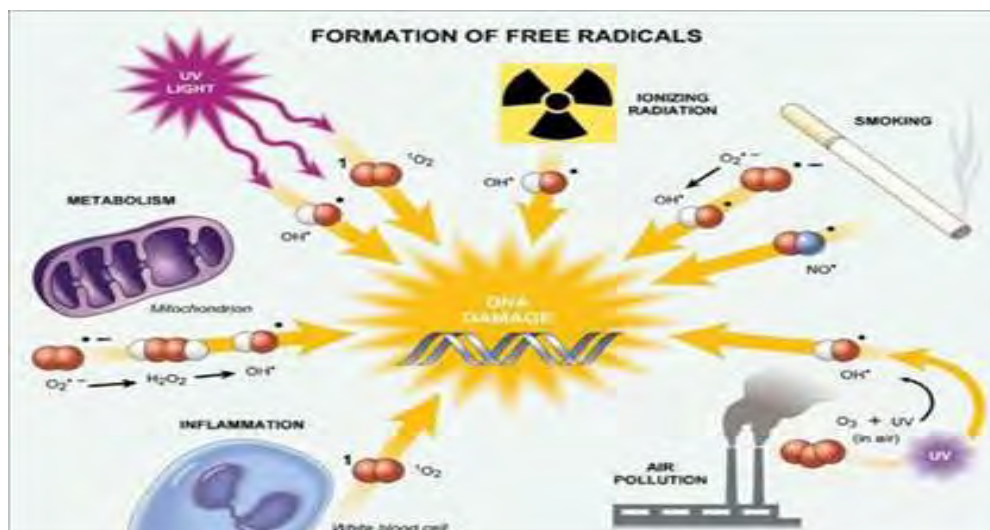
(γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.

(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.

1.2.2 Εξωγενείς πηγές :

Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας.

Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία)(Sotiroudis, 2008).



Εικόνα 2: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

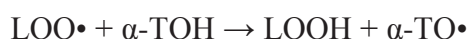
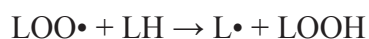
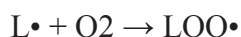
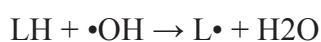
1.3 Βιολογική Δράση Των Δραστικών Ειδών Οξυγόνου

1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις

Όλα τα βιολογικά μόρια που υπάρχουν στον οργανισμό κινδυνεύουν από την προσβολή από ελεύθερες ρίζες. Τα κατεστραμμένα αυτά μόρια μπορούν να βλάψουν κυτταρικές λειτουργίες και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών (TPA Devasagayam 2004).

Λιπίδια: Τα μεμβρανικά λιπίδια που υπάρχουν στα υποκυτταρικά οργανίδια παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες. Όταν τα λιπίδια αντιδράσουν με ελεύθερες ρίζες οδηγούνται σε μια άκρως βλαπτική αλυσιδωτή αντίδραση, την λιπιδική υπεροξειδωση, που έχει άμεσα και έμμεσα αποτελέσματα. Η διαδικασία ξεκινάει μετά από την επίθεση οποιουδήποτε είδους ρίζας που έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από μια μεθυλική ομάδα (CH_2), αφήνοντας έτσι ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο άτομο του άνθρακα ($\bullet CH$). Το ασταθές πλέον άτομο του άνθρακα σταθεροποιείται με ανακατάταξη των μορίων και προκύπτει ένα συζευγμένο διένιο που μπορεί να

αντιδράσει με ένα μόριο οξυγόνου και να δώσει τη ρίζα του λιπιδικού υπεροξειδίου (LOO•). Αυτές οι ρίζες μπορούν να αποσπάσουν περαιτέρω άτομα υδρογόνου από άλλα λιπιδικά μόρια για να δημιουργήσουν λιπιδικά υδρουπεροξειδία (LOOH) και ταυτόχρονα να διαδοθούν περαιτέρω στα λίπη. Η υπεροξειδωση μπορεί να σταματήσει μέσω πολλών αντιδράσεων. Η σημαντικότερη είναι η αντίδραση του LOO• ή του L• με ένα αντιοξειδωτικό μόριο όπως την βιταμίνη E ή την α-τοκοφερόλη για το σχηματισμό της περισσότερο σταθερής ρίζας του φαινοξυλίου της τοκοφερόλης το οποίο δεν συμμετέχει σε άλλες αλυσιδωτές αντιδράσεις και ανακυκλώνεται με τη βοήθεια της βιταμίνης C ή της γλουταθειόνης.



Υδατάνθρακες: Ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) αντιδρούν με τους υδατάνθρακες αποσπώντας τυχαία ένα άτομο υδρογόνου από τα άτομα του άνθρακα με αποτέλεσμα την παραγωγή ρίζας με βάση τον άνθρακα (Kasmas, 2008). Αυτό οδηγεί στην διακοπή των αλυσίδων σημαντικών μορίων όπως το υαλουρονικό οξύ.

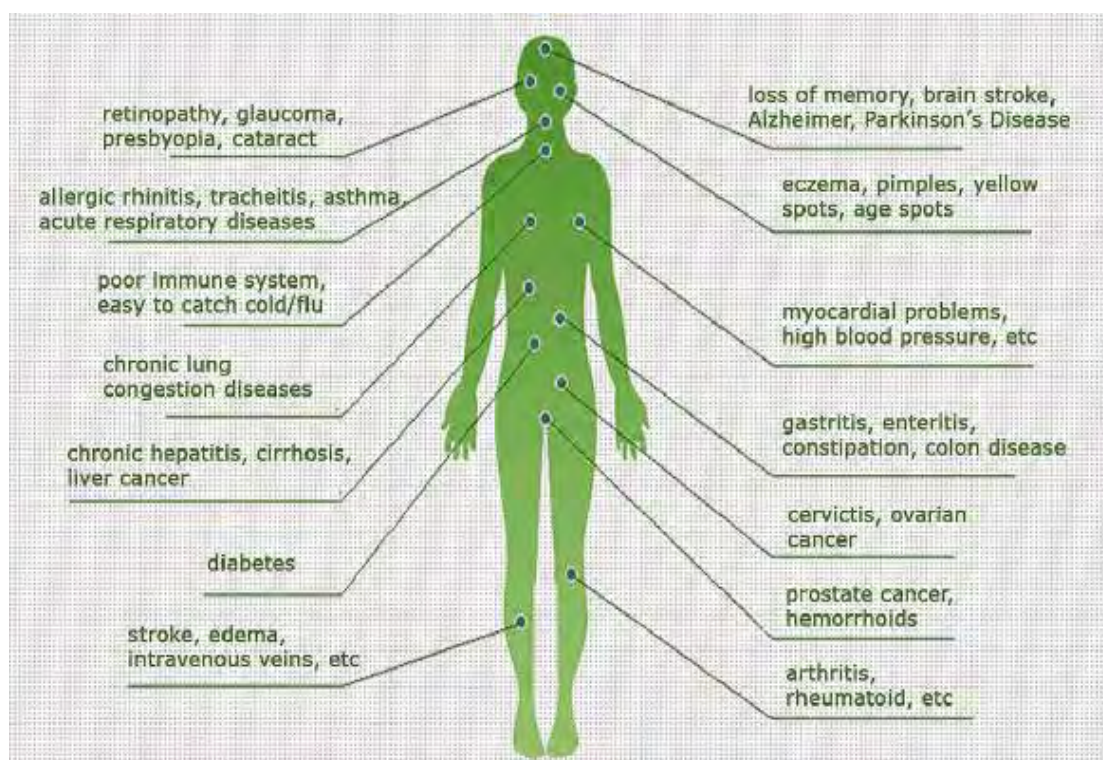
DNA: Η οξειδωτική βλάβη στο DNA είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του DNA με τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS). Ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα του υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και του υδρογόνου ($\text{H}\bullet$) αντιδρούν με το DNA με αλληλεπίδραση με τις βάσεις ή απόσπαση ατόμων υδρογόνου από τα σάκχαρα. Ο C4-C5 διπλός δεσμός της πυριμιδίνης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη ρίζα του υδροξυλίου. Κατά αυτήν την αλληλεπίδραση παράγεται ένα φάσμα προϊόντων οξείδωσης της πυριμιδίνης που περιλαμβάνει thymine glycol, uracil glycol, υπόλειμμα ουρίας, 5-υδροξυ-δεοξουριδίνη, 5-υδροξυ-δεοξυκυτιδίνη, υδαντοΐνη κ.α. Παρομοίως η αλληλεπίδραση της ρίζας του υδροξυλίου με πουρίνες δίνει ως προϊόντα τις 8-υδροξυλο-δεοξυαδενοσίνη, 8-υδροξυλο-δεοξυγουανοσίνη, φορμαμιδοπυριμιδίνες και άλλα προϊόντα οξείδωσης πουρινών. Πολλά επιδιορθωτικά μονοπάτια επιδιορθώνουν τη βλάβη που προκαλείται στο DNA (Halliwell and Aruoma, 1993). Η 8-υδροξυλο-δεοξυγουανοσίνη θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην

καρκινογένεση και αποτελεί έναν έμπιστο δείκτη για οξειδωτική βλάβη στο DNA(Kasmas,2008),

Πρωτεΐνες: Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) οδηγεί στην παραγωγή είτε σταθερών είτε δραστικών προϊόντων όπως τα πρωτεϊνικά υδροπεροξειδία, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή περαιτέρω δραστικών μορίων ειδικά αν αλληλεπιδράσουν με παροδικά μεταλλικά ιόντα. Αν και οι περισσότερες οξειδωμένες πρωτεΐνες που είναι λειτουργικά ανενεργές απομακρύνονται ταχύτατα, ορισμένες από αυτές μπορεί να συσσωρευτούν με την πάροδο του χρόνου και να προκαλέσουν βλάβες που συνδέονται με τη γήρανση και με άλλες ασθένειες. Μια συχνή συνέπεια της οξείδωσης αμινοξέων είναι η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, γεγονός που μπορεί να έχει σαν συνέπεια την αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης και πιθανόν την απώλεια της δράσης της ή την έναρξη δράσης ενός αδρανούς μορίου. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι η αλλαγή της διαμόρφωσης ενός ενζύμου μπορεί να σημάνει τη διακοπή της δράσης του. Αν το ένζυμο αυτό συμμετέχει σε μία αλυσίδα αντιδράσεων, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η συσσώρευση ενός μεταβολικού προϊόντος με πιθανή βλαπτική δράση. Αυτός φαίνεται να είναι ο μηχανισμός θανάτου νευρικών κυττάρων σε πολλές από τις λεγόμενες εκφυλιστικές παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (Goswami et al., 2006). Έτσι, έχει βρεθεί ότι στη χορεία του Huntington το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην παραγωγή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης χαντινγκτίνης και επαγωγή μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Η λιποφουσκίνη είναι ένα σύνολο από υπεροξειδωμένα λίπη και πρωτεΐνες που συσσωρεύεται στα λυσοσώματα γερασμένων κυττάρων και εγκεφαλικών κυττάρων των ασθενών με Alzheimer (Stadtman, 1992).

Επικοινωνία κυττάρων: Η σημαντικότερη μάλλον δράση των ελευθέρων ριζών είναι η διαταραχή που επέρχεται στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην "επικοινωνία" των κυττάρων. Για να επιτευχθεί ομοιόσταση του κυττάρου είναι απαραίτητο να υπάρχει ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης ελευθέρων ριζών. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων όπως κινάσες, φωσφατάσες και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζονται από την

ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση. Η έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικές ουσίες που εξαντλούν τα αποθέματα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, επάγει την G1 φάση του κυττάρου και οδηγεί σε πληθώρα αλλαγών σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (Esposito et al., 2001).



Εικόνα 3: Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες

1.3.3 Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες, εκτός από τη βλαπτική τους δράση, συμμετέχουν σε ορισμένες διεργασίες του οργανισμού παίζοντας σημαντικό και ωφέλιμο ρόλο (TPADevasagayam 2004).

Συμμετέχουν στις εξής διεργασίες:

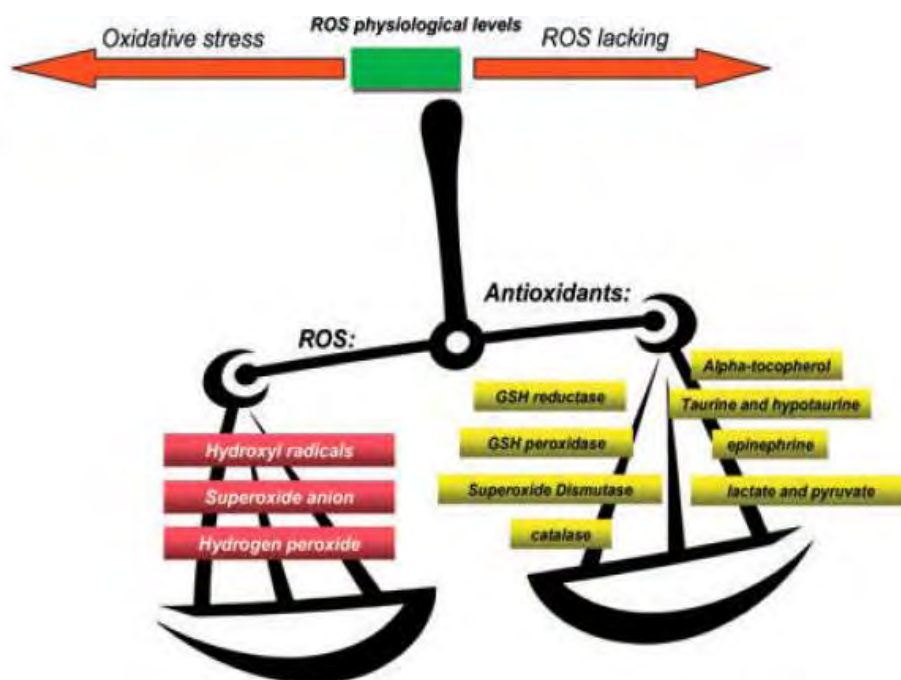
- 1) Δημιουργία ATP από ADP στα μιτοχόνδρια (οξειδωτική φωσφορυλίωση)
- 2) Αποτοξικοποίηση των ξеноβιοτικών ουσιών από το κυτόχρωμα P450 (οξειδωτικά ένζυμα)
- 3) Απόπτωση ελαττωματικών κυττάρων
- 4) Θανάτωση μικροοργανισμών και καρκινικών κυττάρων από τα μακροφάγα και τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα
- 5) Δημιουργία προσταγλανδινών και λευκοτριενίων από οξυγενάσες
- 6) Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν επίσης ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των κυττάρων (Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Linnane et al., 2002).

1. 4 Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες εκτός από τις επιβλαβείς επιδράσεις τους, συμμετέχουν και σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως προαναφέρθηκε. Έτσι στον οργανισμό οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε μία ισορροπία.

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, κατά την οποία υπερισχύει η πρώτη, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (Halliwell & Gutteridge, 1998; Sies, 1985). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS/RNS). Αυτό συμβαίνει είτε από έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε σε παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Κατά το οξειδωτικό στρες, η υπεροχή των οξειδωτικών παραγόντων συνήθως οδηγεί σε πρόκληση βλαβών στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ROS και του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων και από το ενδοκυτταρικό φορτίο των ελευθέρων ριζών. Ο κατάλογος των ασθενειών, που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών συνεχώς αυξάνεται (Halliwell, 2001). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- ο καρκίνος (Toyokuni 1998),
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal 1998),
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans 1993),
- η αθηροσκλήρυνση (Halliwell 1994),
- το AIDS (Baruchel & Wainberg 1992),
- η ηπατίτιδα (Elliot and Strunin 1993)
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke, 1991)



Εικόνα 5: Ασθένειες και οξειδωτικό στρες

1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

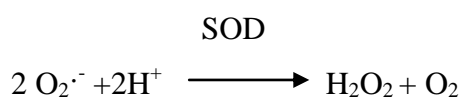
Η έκθεση του οργανισμού στις ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από μια πληθώρα πηγών οδήγησε στην ανάπτυξη αμυντικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Cadenas, 1997). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κατηγοριοποιούνται σε **ενζυματικούς** και **μη ενζυματικούς**.

1.5.1. Ένζυμα με Αντιοξειδωτική Δράση

1.5.1.α. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

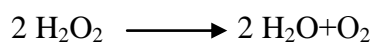
Επιδρά και ελαττώνει τον χρόνο ημίζωής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Υπάρχουν τρεις μορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης. Η πρώτη περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η δεύτερη περιέχει μαγγάνιο και βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και η τρίτη είναι μία υψηλού MB υπεροξειδική δισμουτάση και εντοπίζεται στο πλάσμα και στους πνεύμονες.

Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



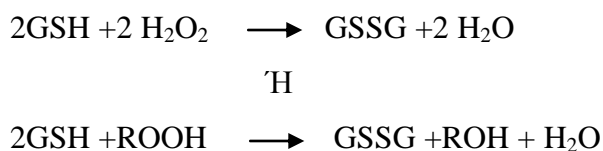
1.5.1.β. Καταλάση (CAT)

Το μόριο είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από 4 δακτυλίους πορφυρίνης με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο. Κάθε μία από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες αποτελείται από περίπου 500 αμινοξέα (Boon et al., 2007). Διασπά το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο, βρίσκεται στα υπεροξυσώματα, τα αιμοπετάλια και τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Καταλύει την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



1.5.1.γ. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Δρα σε οργανικά υπεροξείδια που απελευθερώνονται από τη δράση φωσφολιπασών καθώς και στο H_2O_2 (Thomas et al., 1990). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανάγει τα υδροϋπεροξείδια (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και επίσης ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό ενώ προκαλεί την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



1.5.1.δ. Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της 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-αδενο-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.

1.5.2. Μακρομοριακές Ενώσεις χωρίς Ενζυμική Δράση

1.5.2.α. Γλουταθειόνη

Είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από L-κυστεΐνη, L-γλουταμικό οξύ και γλυκίνη [Ben, 1930]. Βρίσκεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού [Masella et al., 2005]. Η γλουταθειόνη αλληλεπιδρά με οργανικά υπεροξειδία και μετατρέπεται στην οξειδωμένη διμερή της μορφή. Παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης του πυρήνα του κυττάρου από την οποία εξαρτάται η έκφραση ή η καταστολή γονιδίων [Valko et al., 2007]. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού [Nogueira et al., 2004]. Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε άλλα ενζυμικά συστήματα του οργανισμού.

Η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Εξουδετερώνει ρίζες υδροξυλίου, οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξειδίων με τη συνέργεια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων διαμέσου μεμβρανών και επαναφέρει άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες στην ανηγμένη τους μορφή, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η α-τοκοφερόλη [Masella et al., 2005].

1.5.2.β. Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)

Αποτελεί σημαντικότατο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Συντίθεται στο ήπαρ από D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη στα περισσότερα είδη, με εξαίρεση τα πρωτεύοντα. Πηγές πλούσιες σε ασκορβικό οξύ αποτελούν τα λαχανικά και τα φρούτα και ιδιαίτερα τα εσπεριδοειδή.

Η σημασία του ασκορβικού οξέος έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με μια πληθώρα ελευθέρων ριζών όπως ρίζα υδροξυλίου, ατομικό και μοριακό οξυγόνο και υπεροξειδικές ρίζες (Duthie, 1999). Επιπλέον, θεωρείται ότι ανάγει την οξειδωμένη α-τοκοφερόλη (Buettner, 1993) σχηματίζοντας ρίζα ασκορβικού οξέος. Τέλος δημιουργεί χηλικές ενώσεις με ιόντα χαλκού και σιδήρου εμποδίζοντας τη δράση τους (Sies et al., 1995).

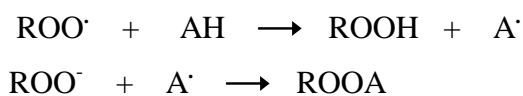
1.5.2.γ. Ουρικό Οξύ

Το ουρικό οξύ στον οργανισμό προέρχεται κυρίως από τον καταβολισμό των πουρινών, από τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και κατέχει σημαντικότατο ρόλο στην διατήρηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης. Ο ρόλος του είναι διττός. Από τη μία πλευρά έχει βρεθεί ότι είναι από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ουσίες εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσής του στο πλάσμα ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη έκβασης σε αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (Waring, 2002), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την *a priori* αντιοξειδωτική του δράση. Μάλιστα, θεωρείται ότι η εξέλιξη των πρωτευόντων και η αύξηση του χρόνου ζωής τους οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των επιπέδων του ουρικού οξέος στο πλάσμα μέσω μεταλλάξεων σε μια σειρά γονιδίων (Cutler, 1976). Αποτελεί σημαντικό σαρωτή ριζών οξυγόνου και υδροξυλίου και φαίνεται ότι προστατεύει τα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων από τη δράση των ελευθέρων ριζών [Ames et al., 1981]. Τα επίπεδά του στο αίμα εξαρτώνται τόσο από την πρόσληψή του με τις τροφές αλλά και την παραγωγή του από τη διάσπαση πουρινών και έχει βρεθεί ότι αυξάνονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, πιθανότατα μέσω μείωσης της νεφρικής απέκκρισής του.

1.5.2.δ. Βιταμίνη E (α-Τοκοφερόλη)

Παράγεται από το ομογεντισικό οξύ σε φυτικούς οργανισμούς. Λόγω της λιπόφιλης της ιδιότητας μπορεί να διαπεράσει σε κυτταρικές μεμβράνες και να προστατεύει τα λιπίδια των τελευταίων από υπεροξειδωση. Η αντιοξειδωτική της δράση ασκείται μέσω προσφοράς του υδρογόνου του αρωματικού υδροξυλίου και η οξειδωμένη μορφή σταθεροποιείται μέσω διασποράς του ασύζευκτου ηλεκτρονίου εντός του αρωματικού δακτυλίου.

Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



1.5.2.ε. Συνένζυμο Q-10 (Ουβικινόνη)

Βρίσκεται στα μιτοχόνδρια όπου χρησιμεύει για τη μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά και σε άλλα οργανύλια του κυττάρου. Εκτός από τη συμμετοχή στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας προστατεύει τα λιπίδια των μεμβρανών από τη δράση των ελευθέρων ριζών (Kawamukai, 2002) όπως και η α-τοκοφερόλη.

1.5.2. στ. Καροτένια

Τα καροτένια είναι τετρατερπένια που αποτελούνται από 8 μονάδες ισοπρενίου και μπορούν να είναι άκυκλα ή να εμπεριέχουν δακτυλίους ατόμων άνθρακα. Τροφές πλούσιες σε καροτένια είναι φρούτα με κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα καθώς και φυλλώδη λαχανικά με σκούρο πράσινο χρώμα. Η κυριότερη αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες ατομικού οξυγόνου (Paiva and Russell, 1999)

1.5.2.ζ. Τρανσφερρίνη – Φερριτίνη

Διατηρούν τον σίδηρο δεσμευμένο σε ανενεργή μορφή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο σίδηρος λειτουργεί ως συνένζυμο οξειδωτικών αντιδράσεων (αντίδραση Fenton) με αποτέλεσμα σε ελεύθερη κατάσταση να προάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Έτσι, οι παραπάνω ουσίες δρουν ως αντιοξειδωτικά δεσμεύοντας τον.

1.5.2.η. Σερουλοπλασμίνη

Είναι μια σφαιρίνη με M.B. 151.000 και αποτελείται από 8 υπομονάδες, καθμία από τις οποίες δεσμεύει από ένα άτομο χαλκού. Παράγεται στο ήπαρ και δεσμεύει περίπου το 90% του κυκλοφορούντος χαλκού στο σώμα. Το υπόλοιπο 10% είναι δεσμευμένο από άλλες πρωτεΐνες με κυριότερη την αλβουμίνη. Ο χαλκός συμμετέχει όπως και ο σίδηρος ως οξειδωτικό μέσο σε πληθώρα αντιδράσεων. Παράλληλα, επηρεάζει και το μεταβολισμό του σιδήρου όπως έχει φανεί σε ασθενείς με παθολογικό μεταβολισμό χαλκού στους οποίους η εξωγενής χορήγηση σερουλοπλασμίνης αυξάνει τα επίπεδα του σιδήρου στο πλάσμα. Πιθανολογείται ότι επηρεάζει την οξείδωση του σιδήρου μεταβάλλοντας τελικά και την απορρόφηση του.

1.5.2.θ. Αλβουμίνη

Είναι η πλέον ευρέως κυκλοφορούσα πρωτεΐνη στο πλάσμα. Αποτελεί δείκτη θρέψης και έχει βρεθεί ότι κατέχει σημαντική θέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων καθώς με την παρουσία γλουταθειόνης, στην ανηγμένη της μορφή, καταλύει την αντίδραση της τελευταίας με ελεύθερες ρίζες (Hurst et al., 1999). Ταυτόχρονα δεσμεύει ελεύθερα ιόντα όπως ο χαλκός εμποδίζοντας τα να συμμετέχουν σε οξειδωτικές αντιδράσεις (Soriani et al., 1994).

1.6 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

Τα τελευταία χρόνια, τα συστατικά του γάλακτος έγιναν αναγνωριστεί ως λειτουργικά τρόφιμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρήση τους έχει άμεση και μετρήσιμη επίδραση στην υγεία (Gill et al., 2000). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα υποπροϊόν της παραγωγής τυριού και γιαουρτιού, θεωρούνταν απόβλητο. Η ανακάλυψη του ρόλου της πρωτεΐνης ορού γάλακτος ως λειτουργικό τρόφιμο με διατροφικές εφαρμογές την καθιέρωσε ως ένα άξιο παραπροϊόν κατά την παραγωγή τυριού (Walzem et al., 2002). Το γάλα περιέχει 2 κύριες πηγές πρωτεϊνών, τις καζεΐνες και την πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Αφού λάβει μέρος η επεξεργασία, οι καζεΐνες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή πηγμένου γάλακτος για τυρί, ενώ η πρωτεΐνη ορού γάλακτος παραμένει σε ένα υδατικό περιβάλλον. Τα συστατικά της πρωτεΐνης ορού γάλακτος περιλαμβάνουν την λακτοπεροξειδάση, τη λακτοφερρίνη, την α-λακταλβουμίνη, την β-λακτοσφαιρίνη, την αλβουμίνη ορού βοδινού και τις

ανοσοσφαιρίνες (Walzem et al., 2002). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος που προκύπτει από το βουτυρόγαλα σε σύγκριση με αυτήν που προέρχεται από το τυρί περιέχει το λιπίδιο σφιγγομυελίνη. Σήμερα, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα ευρέως γνωστό πρωτεϊνικό συμπλήρωμα που εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, ανοσιακή ρύθμιση, βελτίωση της μυϊκής δύναμης και της σύνθεσης του σώματος καθώς και προστασία από καρδιαγγειακές ασθένειες και οστεοπόρωση. Η πρόοδος στην τεχνολογία της επεξεργασίας της είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεθόδων όπως μικροδιήθηση, υπερδιήθηση, αντίστροφη όσμωση και ανταλλαγή ιόντων και αυτό το γεγονός οδήγησε στην ανάπτυξη διαφορετικών τελειοποιημένων προϊόντων πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Το συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος με μειωμένη λακτόζη, η απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος, η υδρολυμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος και η απιονισμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι πλέον διαθέσιμες εμπορικά. Κάθε τελικό προϊόν της πρωτεΐνης ορού γάλακτος διαφέρει στο ποσοστό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, των λιπών, των ανοσοσφαιρινών και της λακτόζης. Αυτές οι μεταβλητές είναι σημαντικοί παράγοντες στην επιλογή των συστατικών της πρωτεΐνης ορού γάλακτος για διαφορετικές διατροφικές εφαρμογές.

1.6.1 Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος

Η πρωτεΐνη από πλήρες γάλα αγελάδας αποτελείται από σχεδόν 20% πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Όταν αφαιρεθεί η καζεΐνη από το πλήρες γάλα, παραμένει η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή, η οποία έχει περίπου 65% συγκέντρωση πρωτεΐνης.

Το γάλα παστεριώνεται σε υψηλή θερμοκρασία για μικρή χρονική περίοδο (72°C, 30s) και διατηρείται όλη τη νύχτα στους 40°C. Έπειτα το μίγμα κρύνει στους 30°C και εμβολιάζεται με καλλιέργεια γαλακτικού οξέος και επωάζεται για 30 λεπτά. Έπειτα προστίθεται το εκχύλισμα πυτιάς και το μίγμα αναδεύεται έως ότου πήξει.

Η πυτιά προέρχεται από τον τέταρτο στόμαχο των νεογέννητων μοσχαριών. Η χυμοσίνη, που αποτελεί το ενεργό ένζυμο της πυτιάς, βοηθά στο πήξιμο του γάλακτος διαχωρίζοντας το σε πηγμένο γάλα για τυρί και σε ορό γάλακτος. Στα νεογέννητα μοσχάρια, η χυμοσίνη βοηθά στη χώνεψη και στην απορρόφηση του γάλακτος. Οι ενήλικες αγελάδες δεν έχουν αυτό το ένζυμο.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή στραγγίζεται διαμέσου κοσκίνων από ανοξείδωτο ατσάλι και το πηγμένο γάλα για τυρί που παραμένει κόβεται και

θερμαίνεται στους 30°C. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή έπειτα φιλτράρεται στους 45°C και προστίθεται κιτρικό οξύ έτσι ώστε το pH να πέσει στους 3 βαθμούς. Το υγρό φιλτράρεται έπειτα στο 1/5 του συνολικού του όγκου με αποτέλεσμα να παράγεται το συμπύκνωμα του ορού γάλακτος το οποίο περιέχει περίπου 80% πρωτεΐνη. Το συμπύκνωμα μπορεί έπειτα να μικροδιηθηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να φτάσει το 95%.

Το τελικό συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος θερμαίνεται και ξηραίνεται με ψεκασμό έτσι ώστε να προκύψει η σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Με τη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να αφαιρεθεί η λακτόζη και τα λίπη από το συμπύκνωμα. Πολλοί παραγωγοί υδρολύουν (μέσω θέρμανσης ή χρήσης περιοριστικών ενζύμων) την πρωτεΐνη ορού γάλακτος με σκοπό να παρέχουν περισσότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα στο τελικό προϊόν.

Η εμπορική επιτυχία της πρωτεΐνης ορού γάλακτος οδήγησε στην ανάπτυξη υψηλών προϊόντων της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σαν κύρια προϊόντα και όχι ως παραπροϊόντα της παραγωγής τυριού. Οι παρασκευαστές δίνουν μεγάλη βαρύτητα στην διατήρηση της βιολογικής λειτουργίας και την αρχική πρωτεϊνική δομή στο τελικό προϊόν. Οι πρωτεΐνες επεξεργάζονται κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες και δεν εκτίθενται σε κυμαινόμενο pH για να αποφευχθεί η μετουσίωση των αρχικών πρωτεϊνικών δομών

1.6.2 Βιολογικά συστατικά

1.6.2.a. Περιεχόμενο αμινοξέων

Συγκεντρωτικά, το συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχει όλα τα ουσιώδη αμινοξέα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με διαφορές φυτικές πηγές πρωτεϊνών όπως σόγια και γλουτένη σίτου (Walzem et al., 2002). Εκτός του ότι έχει ένα πλήρες φάσμα αμινοξέων, τα αμινοξέα που βρίσκονται στο συμπύκνωμα απορροφούνται και χρησιμοποιούνται πολύ αποδοτικότερα σε σχέση με τα διαλύματα ελεύθερων αμινοξέων (Daenzer et al., 2001).

Σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεΐνης, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει υψηλή συγκέντρωση σε διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέα: λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη. Τα αμινοξέα αυτά και ιδιαίτερα η ισολευκίνη είναι σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών. Επίσης το συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος είναι πλούσιο σε αμινοξέα που περιέχουν θείο, δηλαδή σε κυστεΐνη

και μεθειονίνη. Η υψηλή συγκέντρωση των αμινοξέων αυτών ενισχύει την ανοσοποιητική λειτουργία μέσω της ενδοκυτταρικής μετατροπής σε γλουταθειόνη.

1.6.2.β. Λακτοφερρίνη

Η λακτοφερρίνη είναι μια σιδηροδεσμευτική γλυκοπρωτεΐνη. Έχει μη ενζυμική αντιοξειδωτική δράση και βρίσκεται στο κλάσμα του τυρογάλακτος στο γάλα καθώς και στο πρωτόγαλα. Η λακτοφερρίνη που βρίσκεται στο τυρόγαλο αποτελείται από περίπου 689 κατάλοιπα αμινοξέων ενώ η ανθρώπινη λακτοφερρίνη αποτελείται από 691 κατάλοιπα (Pierce et al., 1991). Έχει 2 θέσεις δέσμευσης ιόντων σιδήρου. Η συγκέντρωση των περισσότερων εμπορικών σκονών πρωτεΐνης τυρογάλακτος περιλαμβάνει λακτοφερρίνη σε ποσοστό 0.35-2% των συνολικών πρωτεϊνών του ορρού γάλακτος.

1.6.2.γ. Ανοσοσφαιρίνες

Μια ανοσοσφαιρίνη είναι ένα αντίσωμα γ-σφαιρίνης. Υπάρχουν 5 τάξεις αντισωμάτων: IgA, IgD, IgE, IgG, και IgM. IgG. Το πρωτόγαλα περιέχει σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι του ώριμου γάλακτος. Το συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορρού γάλακτος περιέχει σημαντικό ποσοστό ανοσοσφαιρινών, περίπου 10-15 % των συνολικών πρωτεϊνών τυρογάλακτος. Σε μια *in vitro* μελέτη αναφέρεται ότι η IgG που προέρχεται από το γάλα μπορεί σε συγκέντρωση 0.3 mg/mL να καταστέλλει την πολλαπλασιαστική απάντηση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στα T κύτταρα.

1.6.2.δ. β-Λακτοσφαιρίνη

Η β-λακτοσφαιρίνη αντιπροσωπεύει σχεδόν το μισό της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών στον αγελαδινό ορό γάλακτος ενώ το ανθρώπινο γάλα δεν περιέχει β-λακτοσφαιρίνη. Η πρωτεΐνη αυτή εκτός του ότι περιέχει ουσιαστικά και διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέα, περιέχει στη δομή της και μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ρετινόλη. Η πρωτεΐνη αυτή είναι φορέας μικρών υδρόφοβων μορίων που περιλαμβάνουν το ρετινοϊκό οξύ, το οποίο έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει λεμφικές αποκρίσεις (Guimont et al., 1997).

1.6.2.ε. α-Λακταλβουμίνη

Η α-λακταλβουμίνη είναι μια από τις κυριότερες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο ανθρώπινο και στο αγελαδινό γάλα. Αποτελεί περίπου το 20-25% των πρωτεϊνών τυρογάλακτος και περιέχει μια μεγάλη ποικιλία ουσιαστικών και διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέων. Η καθαρή α-λακταλβουμίνη χρησιμοποιείται κυρίως στην παρασκευή βρεφικών συμπληρωμάτων καθώς έχει παρόμοιο πρωτεϊνικό προφίλ με το μητρικό γάλα. Σε μελέτες σε αρουραίους η α-λακταλβουμίνη (και σε φυσιολογική και σε υδρολυμένη μορφή) ενίσχυσε την ανταπόκριση των αντισωμάτων σε συστηματική διέγερση αντιγόνων (Bounous et al., 1982). Η ίδια ομάδα απέδειξε ότι η α-λακταλβουμίνη έχει άμεση επίδραση στη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων καθώς καταστέλλει τις αποκρίσεις που εξαρτώνται από τα Τ κύτταρα αλλά και τις ανεξάρτητες με αυτά (Bounous et al., 1985).

1.6.2.στ. Λακτοπεροξειδάση

Ο ορός γάλακτος περιλαμβάνει πολλούς τύπους ενζύμων (υδρολάσες, τρανσφεράσες, λυάσες, πρωτεάσες και λιπάσες). Η λακτοπεροξειδάση είναι ένα σημαντικό ένζυμο στο κλάσμα του τυρογάλακτος. Είναι το πιο άφθονο ένζυμο και η πλειοψηφία του καταλήγει στον ορό γάλακτος κατά τη διαδικασία παραγωγής γιαουρτιού. Αντιπροσωπεύει το 0.25-0.5 % του συνόλου πρωτεϊνών που βρίσκεται στο τυρόγαλο. Έχει την ικανότητα να καταλύει συγκεκριμένα μόρια, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Καταλύει την υπεροξειδωση του θειοκυανικού και ορισμένων αλογονιδίων (ιώδιο, βρώμιο) και παράγονται προϊόντα που αναστέλλουν και/ή σκοτώνουν ένα πλήθος βακτηριακών ειδών (Kussendrager et al., 2000).

1.6.2.ζ. Αλβουμίνη ορού βοδινού

Η αλβουμίνη ορού βοδινού είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη που αποτελεί το 10-15% του συνόλου πρωτεϊνών που βρίσκεται στο τυρόγαλο. Η αλβουμίνη ορού βοδινού είναι μια πηγή ουσιαστικών αμινοξέων αλλά υπάρχει προς το παρόν πολύ λίγες πληροφορίες για πιθανή θεραπευτική της δράση.

1.6.2.η. Γλυκομακροπεπτίδια

Τα γλυκομακροπεπτίδια αναφέρονται επίσης ως μακροπεπτίδια καζεΐνης. Τα γλυκομακροπεπτίδια είναι παρόντα στον ορρό γάλακτος σε ποσοστό 10-15% λόγω της δράσης της χυμοσίνης στην καζεΐνη κατά την παραγωγή τυριού. Τα γλυκομακροπεπτίδια είναι παρόντα μόνο όταν η χυμοσίνη χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία. Έτσι τα είδη τυριού που παράγονται χωρίς χυμοσίνη(όπως το τυρί cottage) δεν παράγουν γλυκομακροπεπτίδια κατά τη διάρκεια της πήξης. Τα γλυκομακροπεπτίδια είναι υψηλά σε αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και έχουν έλλειψη σε αρωματικά αμινοξέα όπως φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη. Είναι ένα από τα λίγα προϊόντα που παράγονται φυσικά και έχουν έλλειψη σε αυτά τα αμινοξέα και έτσι καθίστανται ασφαλή για πρόσληψη από άτομα με φαινυλκετονουρία.

1.6.3 Μηχανισμός δράσης

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει πιθανή αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς με την προσφορά πρωτεϊνών πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες βοηθούν στην σύνθεση της γλουταθειόνης, ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο (Walzem et al., 2002). Η γλουταθειόνη αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμινικό και κυστεΐνη (Εικόνα 6). Η κυστεΐνη περιέχει μια ομάδαθειόλης (σουλφυδρική) που έχει αναγωγικό ρόλο και εμποδίζει την οξείδωση και την ιστική βλάβη. Ως αντιοξειδωτικό η γλουταθειόνη είναι περισσότερο αποδοτική στην ανηγμένη της μορφή. Η ριβοφλαβίνη, το νιασιναμίδιο και η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι σημαντικοί συμπαράγοντες στην αναγωγή της γλουταθειόνης (Marz, 2002). Σαν αποτέλεσμα του αντιοξειδωτικού της χαρακτήρα, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μελετάται κ ως αντιγηραντικός παράγοντας.

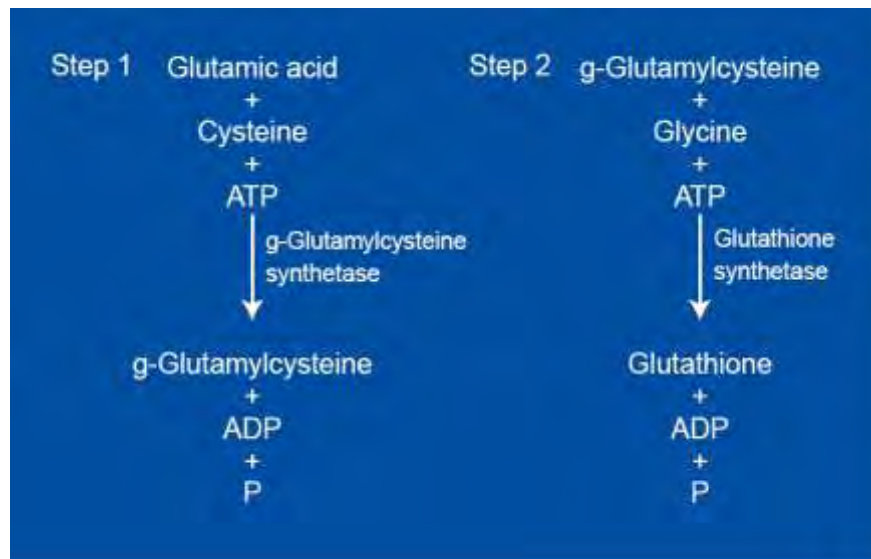
Ως ένας παράγοντας αποτοξίνωσης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η οποία προέρχεται από σελήνιο και κυστεΐνη, είναι ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο με ικανότητα να μετατρέπει τα λιπιδικά υπεροξείδια σε λιγότερο βλαβερά υδροξυ-οξέα. Οι υπεροξειδάσες αλληλεπιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το ανάγουν σε νερό, εξουδετερώνοντας το οξειδωτικό του δυναμικό. Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και η συγκέντρωση του σεληνίου ελαττώνονται καθώς η γαλουχία συνεχίζει, με αποκορύφωμα σχεδόν ένα μήνα μετά την έναρξη της διαδικασίας. Οι επαγγελματίες χρησιμοποιούν προϊόντα πρωτεΐνης τυρογάλακτος ως πηγή κυστεΐνης για να αυξήσουν τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής

γλουταθειόνης (Crippion, 2000) και έχει αναφερθεί ότι η δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο αγελαδινό γάλα και κατ'επέκταση και στον ορό γάλακτος είναι η ίδια με τη δράση που έχει στο ανθρώπινο γάλα.

Μελέτες για τη λακτοφερρίνη απέδειξαν την ικανότητα της να ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα και τα NK κύτταρα και ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων. Η λακτοφερρίνη επίσης φέρεται να έχει ιδιότητες έναντι ιών, μυκήτων και βακτηρίων. Η αντιβακτηριακή ιδιότητα είναι πιθανότερη σε οργανισμούς που απαιτούν σίδηρο για να αναπαραχθούν, καθώς η λακτοφερρίνη έχει τη μοναδική ικανότητα να προσδένει χηλικά το σίδηρο με τέτοιο τρόπο που αποτρέπει τους μικροοργανισμούς από την πρόσληψη του για να αναπτυχθούν. Επίσης η λακτοφερρίνη έχει την ικανότητα να προκαλέσει την αποσύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης των Gram- βακτηρίων που αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες και έτσι δρα και ως αντιβιοτικό.

Η λακτοφερρίνη έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τα επίπεδα του TNF και της IL6 με αποτέλεσμα να μειώνει τη φλεγμονή και κατ'επέκταση τη θνησιμότητα (Machnicki et al., 1993).

Επίσης, η α-λακταλβουμίνη μπορεί να δράσει ως χηλικός παράγοντας για τα βαρέα μέταλλα μειώνοντας έτσι το οξειδωτικό στρες με πρόσδεση σιδήρου (Ha et al., 2003).



Εικόνα 6: Σύνθεση γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμινικό και γλυκίνη

1.7 Πρωτεΐνη σόγιας

Η σόγια είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη πηγή πρωτεϊνών από λαχανικά. Είναι ένα όσπριο πλούσιο σε φαινολικές ουσίες. Ο κύαμος της σόγιας χρονολογείται από το 2838 π.Χ. στην Κίνα και θεωρούνταν τόσο πολύτιμο όπως το σιτάρι και το ρύζι. Σήμερα η πρωτεΐνη σόγιας θεωρείται ισάξια με την ζωική πρωτεΐνη με βαθμό 1.0 (ο υψηλότερος) στη κλίμακα PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) που δείχνει την αποδοτικότητα και την ποιότητα της πρωτεΐνης σε ένα τρόφιμο.

Η ποιότητα της σόγια την καθιστά μια πολύ καλή πηγή πρωτεΐνης για άτομα που θέλουν μια μη ζωική πηγή πρωτεϊνών στη διαίτα τους ή είναι δυσανεκτικοί στην λακτόζη. Έχουν αναφερθεί πολλά οφέλη της πρωτεΐνης σόγιας που σχετίζονται με την υγεία και την απόδοση (π.χ. μείωση των λιπιδικών προφίλ στο πλάσμα, αύξηση της οξειδωσης της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας και μείωση της αρτηριακής πίεσης)

Η σόγια απαντάται σε 3 κατηγορίες: α) αλεύρι (το οποίο δέχεται περαιτέρω επεξεργασία και διαχωρίζεται σε πλήρες που περιέχει φυσικά έλαια, σε άπαχο και σε λεκιθινωμένο στο οποίο έχει προστεθεί λεκιθίνη, β) συμπύκνωμα και γ) απομονωμένη. Η λιγότερο εξευγενισμένη μορφή είναι αυτή του αλευριού.

Πρωτεϊνική σύνθεση των 3 μορφών σόγιας	
Είδος σόγιας	Πρωτεϊνική σύνθεση
Αλεύρι	50%
Συμπύκνωμα	70%
Απομονωμένη	90%

1.7.1 Συμπύκνωμα σόγιας: Παρασκευή και οφέλη

Το συμπύκνωμα σόγιας αναπτύχθηκε στα τέλη του 1960. Φτιάχνεται από αποβουτυρωμένη σόγια. Οι διαλυτοί υδατάνθρακες (ολιγοσακχαρίτες) απομακρύνονται από την αποβουτυρωμένη σόγια. Δυο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του συμπυκνώματος σόγιας: α) η μέθοδος εξαγωγής των υδατανθράκων και β) η ενζυμική υποβάθμιση των υδατανθράκων.

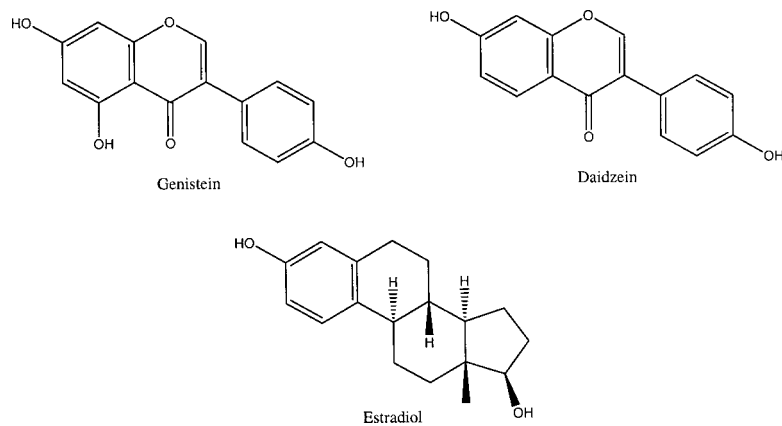
Οι 2 αυτές μέθοδοι οδηγούν σε παραγωγή προϊόντων με διαφορετική διατροφική σύνθεση. Το συμπύκνωμα σόγιας έχει σημαντικά υψηλότερη διατροφική αξία σε

σχέση με ένα γεύμα με σόγια και χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε ολιγοσακχαρίτες (<3%) και αντιγονικούς παράγοντες (<100 p.p.m.). Το συμπύκνωμα σόγιας είναι μια εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους αντί για υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη ζωικής προελεύσεως όπως τη σκόνη άπαχου γάλακτος.

Αν και διατηρεί το περισσότερο από το πρωτεϊνικό περιεχόμενο δεν έχει πολλούς διαλυτούς υδατάνθρακες όπως το αλεύρι και έτσι είναι πιο εύγευστο. Είναι ιδιαίτερα εύπεπτο και βρίσκεται σε μπάρες διατροφής, δημητριακά και γιαούρτια. Για χρόνια η σόγια αποτελεί μέρος της ανθρώπινης διαίτας. Τα διατροφικά οφέλη της σόγιας είναι πολλά όπως φαίνεται από διάφορες μελέτες. Επιδημιολόγοι που μελέτησαν πληθυσμούς που λάμβαναν μεγάλη ποσότητα σόγιας μέσω της διατροφής κατέληξαν ότι αυτοί οι πληθυσμοί είχαν μειωμένα περιστατικά συγκεκριμένων τύπων καρκίνων, μειωμένα καρδιακά περιστατικά και βελτιώσεις σε συμπτώματα εμμηνόπαυσης και οστεοπόρωσης στις γυναίκες (Hasler, 2002). Βασισμένοι σε ένα πλήθος μελετών που εξετάζουν τα οφέλη της πρωτεΐνης σόγιας, η Αμερικανική Καρδιολογική Ομοσπονδία εξέθεσε μια ανακοίνωση που πρότεινε ότι τα τρόφιμα με πρωτεΐνη σόγιας σε συνδυασμό με δίαιτα χαμηλή σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη επηρεάζουν θετικά την υγεία της καρδιάς (Erdman 2000).

Τα οφέλη της σόγιας συνδέονται με τα φυσιολογικά ενεργά στοιχεία που αποτελούν μέρος της σόγιας όπως αναστολείς πρωτεασών, φυτοστερόλες, σαπωνίνες και ισοφλαβόνες (Potter 2000). Τα στοιχεία αυτά συμβάλλουν στη μείωση των λιπιδικών προφίλ στο πλάσμα, αύξηση της οξειδωσης της χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας και μείωση της αρτηριακής πίεσης.

Τα ισοφλαβονοειδή είναι μια μοναδική υποομάδα των φλαβονοειδών και μια από τις μεγαλύτερες τάξεις των φιλικών φαινολικών ουσιών με περίπου 5000 ενώσεις μέλη. Βρίσκονται κυρίως στον κύαμο της σόγιας. Τα κυριότερα ισοφλαβονοειδή που βρίσκονται στη σόγια είναι η γενινσταΐνη, η δαιδζεΐνη και η οιστραδιόλη.



Εικόνα 7: Τα ισοφλαβονοειδή γενινσταΐνη, δαιδζείνη και οιστραδιόλη

Τα ισοφλαβονοειδή και γενικά οι φαινολικές ενώσεις προκύπτουν ως τμήματα που συνδέουν γλυκοσΐδια και ονομάζονται γλυκόνες (Rao and Muralikrishna, 2002; Peterson et al., 1998). Όμως η αγλυκονική μορφή των ισοφλαβονοειδών είναι αυτή που είναι μεταβολικά ενεργή. Μετά την κατανάλωση, προβιοτικά βακτηριακά ένζυμα στο έντερο κόβουν τα γλυκοσιδικά τμήματα από τα γλυκονικά ισοφλαβονοειδή και απελευθερώνεται η αγλυκονική μορφή τους. Έχει βρεθεί ότι οι αγλυκονικές φαινολικές ενώσεις έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση και απελευθερώνονται ταχύτερα από την γλυκονική μορφή τους (Murota et al., 2002; Setchell et al., 2002). Υπάρχουν πολλές μελέτες στις οποίες αναδεικνύονται οι θετικές βιολογικές επιδράσεις των ισοφλαβονοειδών. Έχει αποδειχθεί ότι το ισοφλαβονοειδές γενινσταΐνη έχει ανασταλτική δράση για την τοποϊσομεράση II (Okura et al., 1988), για την κινάση της τυροσίνης (Akiyama et al., 1987), τον NF-κB (Gong et al., 2003) και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Wang et al., 2001).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αιγοπρόβειας και αγελαδινής πρωτεΐνης τυρογάλακτος, της πρωτεΐνης σόγιας και της πρωτεΐνης εκχυλίσματος βοδινού κρέατος.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζύλιο (1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl, DPPH[•]), 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid), ABTS), Nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate(PMS), nicotine adenine dinucleotide(NADH), Iron chloride, και το ένζυμο περοξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Το χημικό αντιδραστήριο Na₂SO₄ αποκτήθηκε από την εταιρεία Panreac, Chem-Lab NV., Zedelgen Belgium.

Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε αποκτήθηκε από την εταιρεία J.T. Baker, UN1230, Deventer Holland

Τα χημικά αντιδραστήρια NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) και TCA (trichloroacetic acid) αποκτήθηκαν από την εταιρεία MERCK, Darmstadt F.R. Germany.

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο HITACHI U-1500.

Πρωτεϊνικά σκευάσματα:

- 1) Πρωτεΐνη βοδινού κρέατος (62%)
- 2) Πρωτεΐνη σόγιας (73,8%)
- 3) Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (78,8%)
- 4) Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (73,8%)

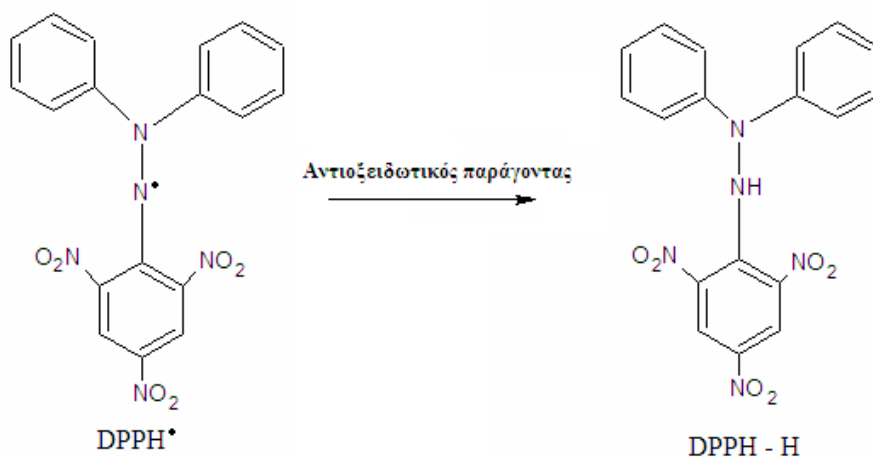
3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•]

Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•] πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brad-Williams et al. (Brad-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και

απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.



Εικόνα 8: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}

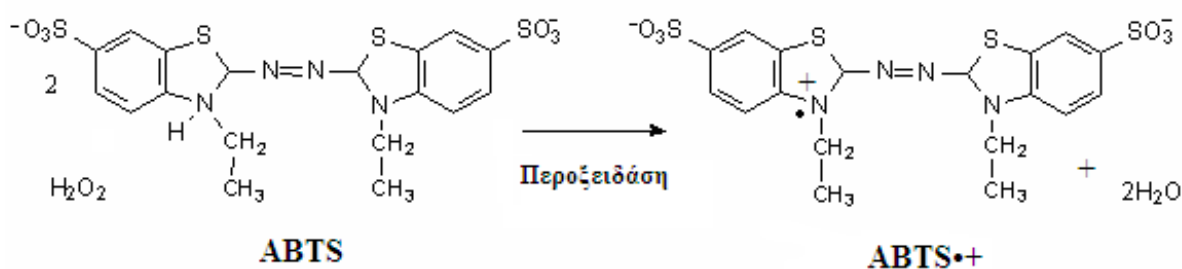
Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS^{•+} είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH[•], η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω

προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH[•], η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS^{•+} πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS). Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS^{•+} και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS^{•+} από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂.



Εικόνα 9: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $\text{OH}\cdot$

Αρχή της Μεθόδου

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton και διασπάται σε μαλονδιαλδεύδη (Gutteridge, 1984,1987). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου εκτιμάται ως ο ρυθμός αναστολής της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες υδροξυλίου. Η απορρόφηση μετράται στα 520 nm.

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) έγινε με τη μέθοδο των Chung et al.,1997.

3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$)

Αρχή της Μεθόδου

Η ρίζα του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$) έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $\text{O}_2\cdot^-$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT²⁺ με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT.

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004.

3.2.5 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγική δύναμη σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ιδιότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

3.3 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παραγόντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης του τεστ του Tukey. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση 4 πρωτεϊνών: της πρωτεΐνης βοδινού, της σόγιας, της αγελαδινής και αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Πραγματοποιήθηκαν 5 μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των πρωτεϊνών: 1) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•], 2) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}, 3) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•], 4) Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{•-}, 5) Μέθοδος προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Οι τιμές IC₅₀ είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής των ριζών κάθε πρωτεΐνης. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για την εκάστοτε πρωτεΐνη.

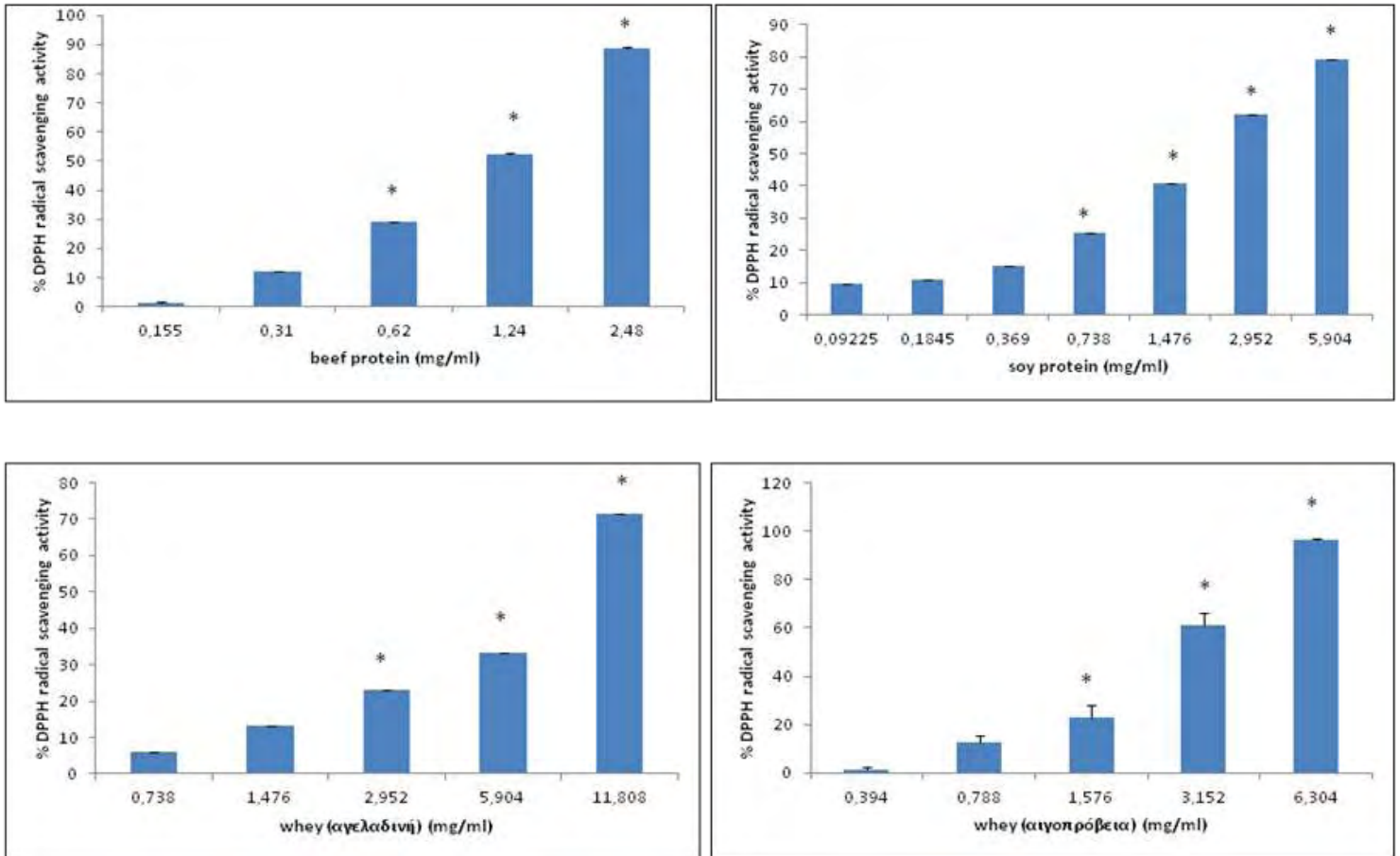
Πιο συγκεκριμένα:

- Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•]: Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, αυξάνεται και η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•]. Η σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•] είναι η ακόλουθη: Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=8,2mg/ml**) < Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=3,1mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**IC₅₀=2,2mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**IC₅₀=1,3mg/ml**).
- Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}: Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, αυξάνεται και η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}. Η σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+} είναι η ακόλουθη: Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=4,1mg/ml**) < Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=3,9 mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**IC₅₀=3,1mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**IC₅₀=0,6 mg/ml**).
- Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•]: Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, αυξάνεται και η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•]. Η

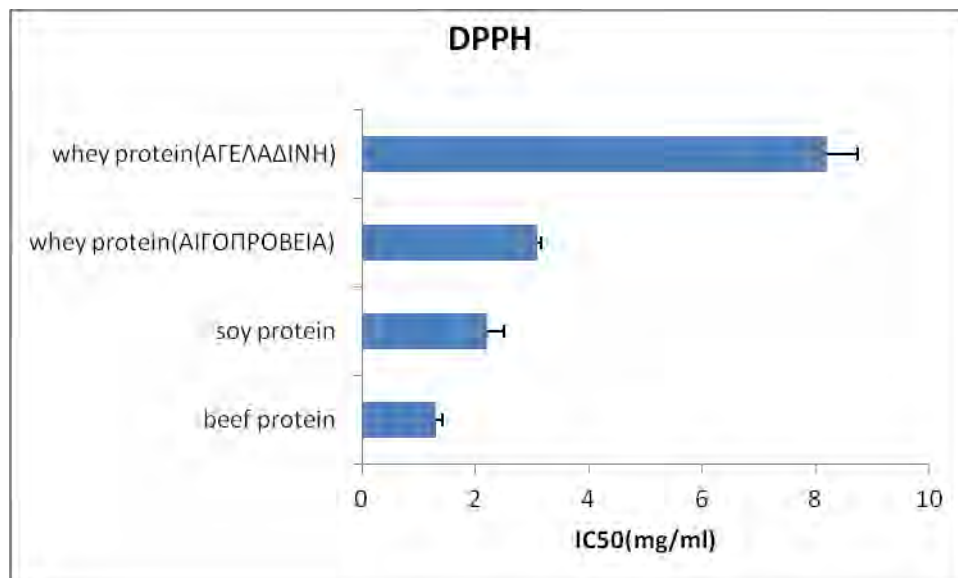
σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $\text{OH}\cdot$ είναι η ακόλουθη: Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος ($\text{IC}_{50}=1,8\text{mg/ml}$) < Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος ($\text{IC}_{50}=1,7\text{mg/ml}$) < Πρωτεΐνη σόγιας ($\text{IC}_{50}=1,1\text{mg/ml}$) < Πρωτεΐνη βοδινού ($\text{IC}_{50}=0,85\text{mg/ml}$).

- Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $\text{O}_2\cdot^-$: Μόνο η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε ανασταλτική δράση απέναντι στη ρίζα $\text{O}_2\cdot^-$ με τιμή $\text{IC}_{50}= 2,5 \text{ mg/ml}$. Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, εμφανίζεται αυξημένη ανασταλτική δράση.
- Αναγωγική Δύναμη: Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών, έχουμε αυξανόμενη απορρόφηση στα 700nm και συνεπώς αυξανόμενη αναγωγική δύναμη. Προσδιορίστηκε για κάθε πρωτεΐνη το $\text{RP}_{0.5\text{AU}}$ (η συγκέντρωση που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700nm. Η σειρά αυξανόμενης αναγωγικής δύναμης είναι η ακόλουθη: Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος ($\text{RP}_{0.5\text{AU}}=4,8 \text{ mg/ml}$) < Πρωτεΐνη σόγιας ($\text{RP}_{0.5\text{AU}}=4,6 \text{ mg/ml}$) < Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος ($\text{RP}_{0.5\text{AU}}=1,3 \text{ mg/ml}$) < Πρωτεΐνη βοδινού ($\text{RP}_{0.5\text{AU}}=0,9 \text{ mg/ml}$).

4.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH

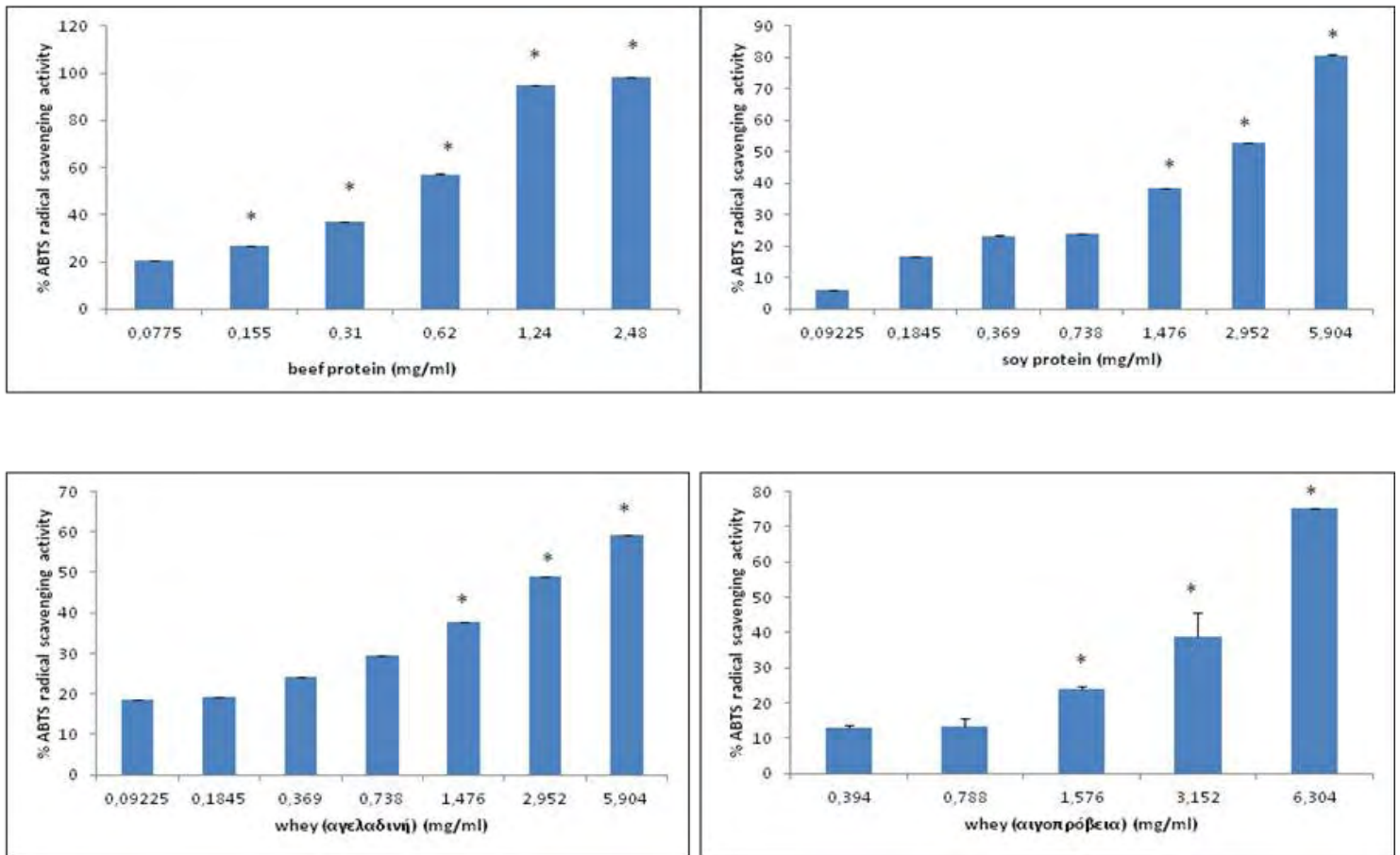


Γράφημα 1: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

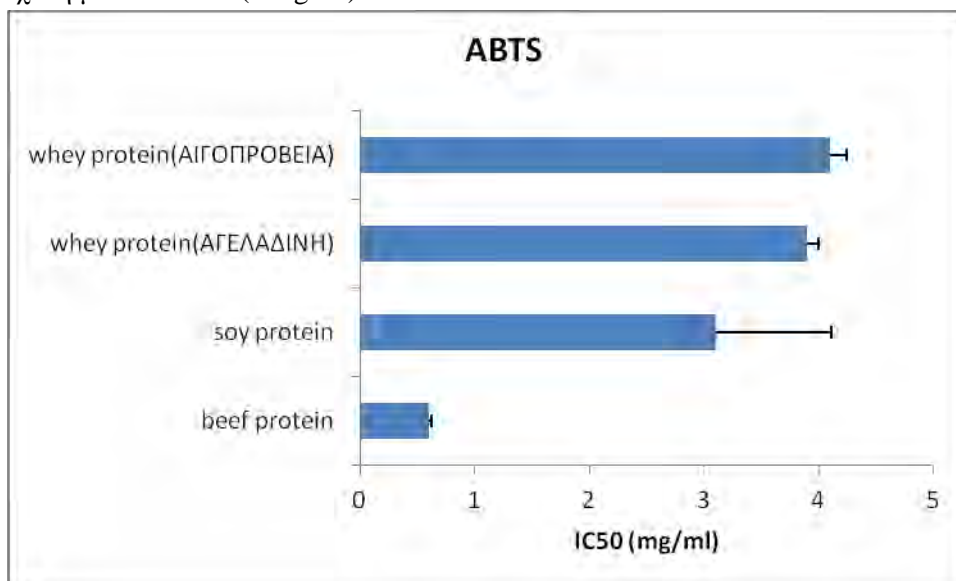


Γράφημα 2: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

4.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}

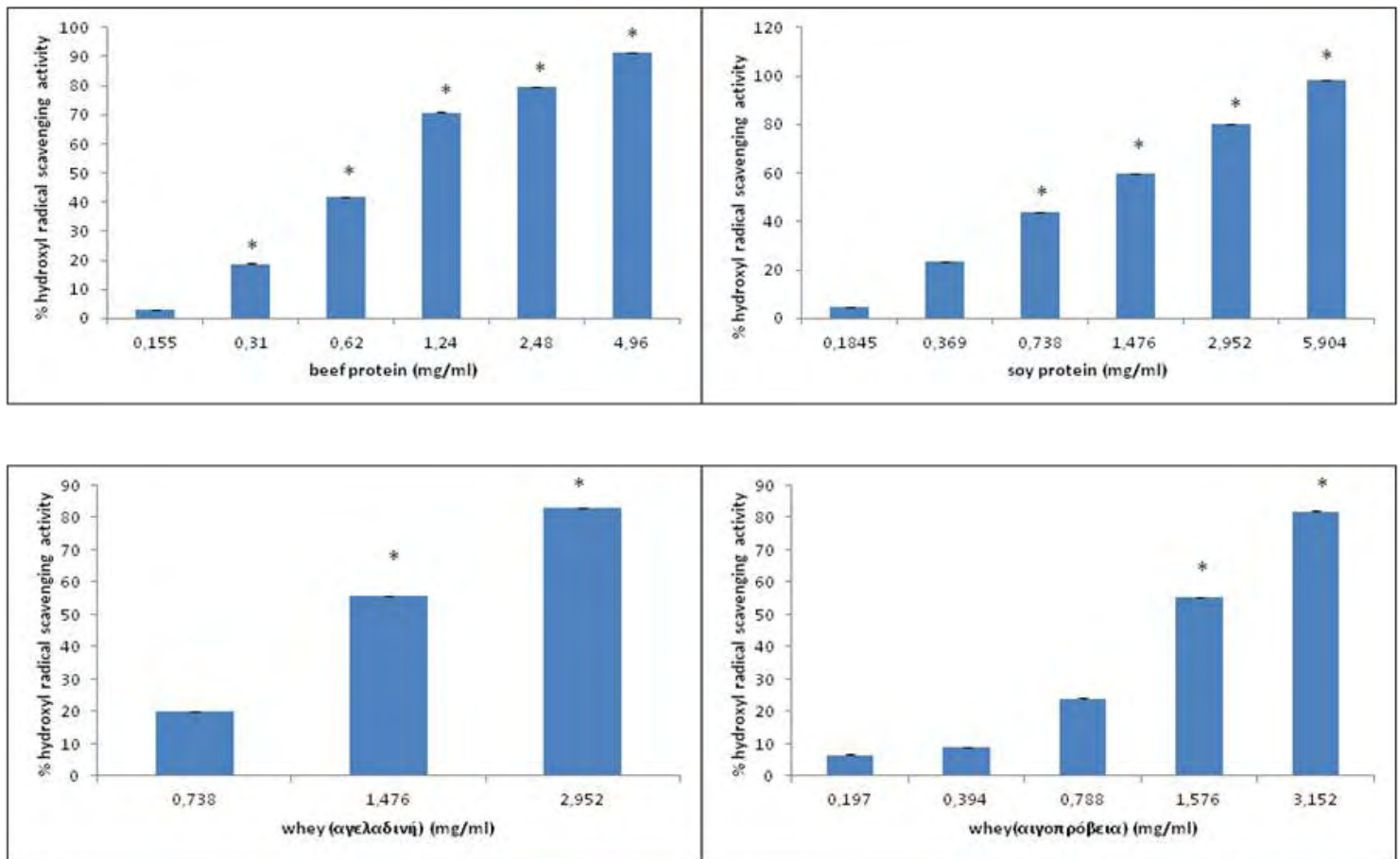


Γράφημα 3: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+} της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

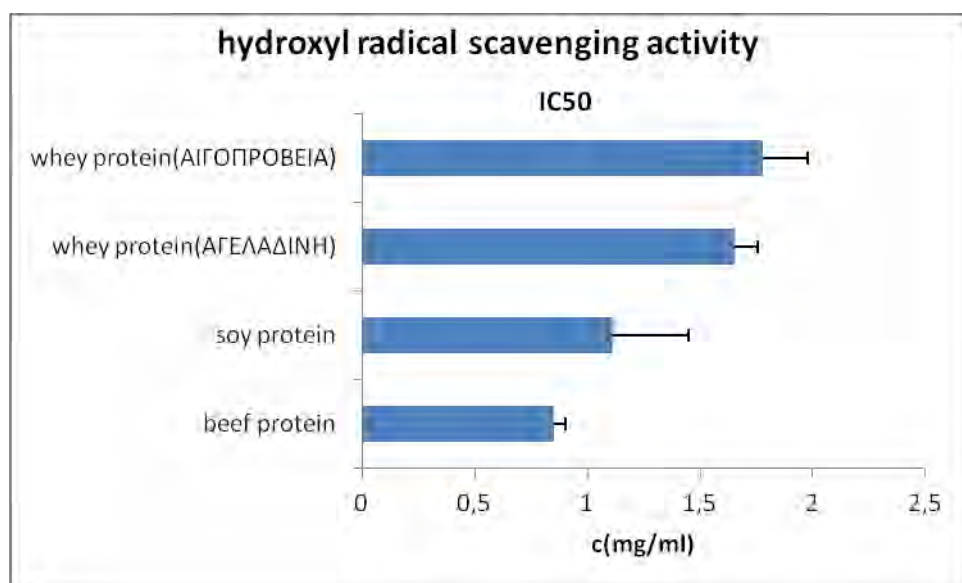


Γράφημα 4: Τιμές IC₅₀ της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

4.3 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH•

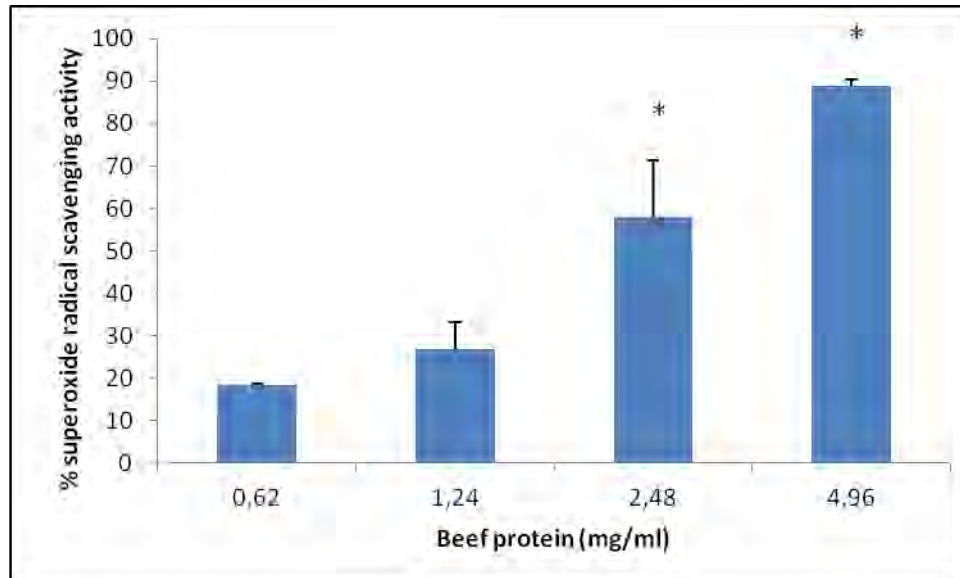


Γράφημα 5: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH• της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).



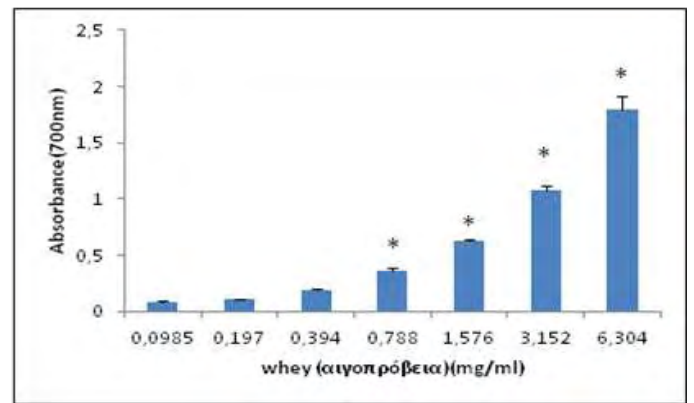
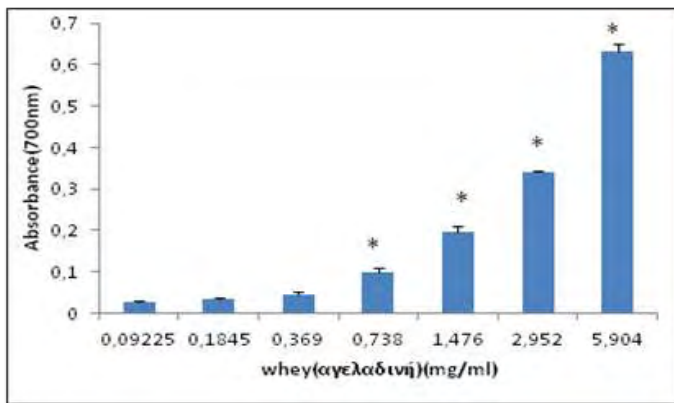
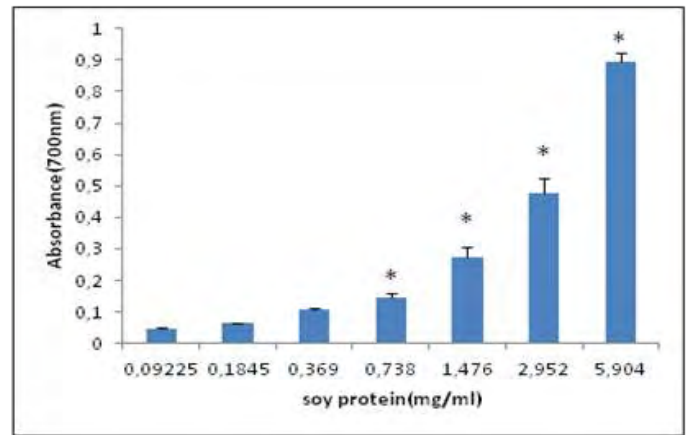
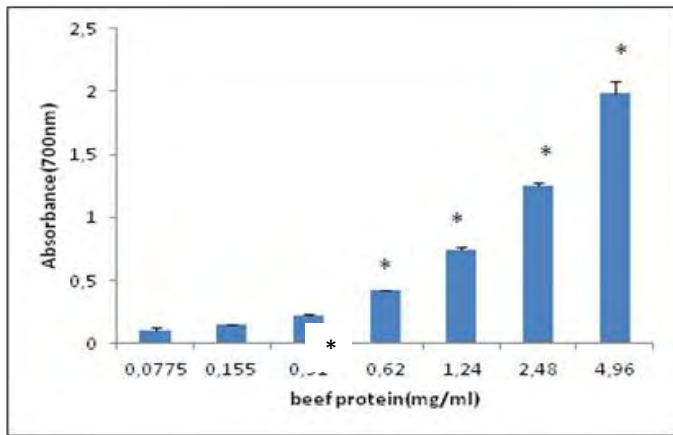
Γράφημα 6: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

4.4 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ($O_2^{\cdot -}$)

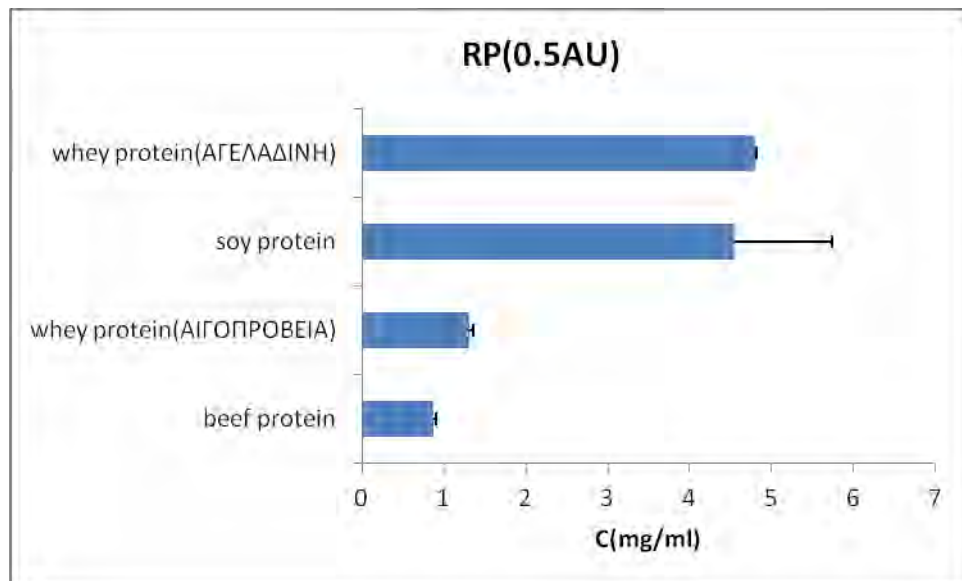


Γράφημα 7: Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH^{\cdot} της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).

4.5 Αναγωγική Δύναμη



Γράφημα 8: Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (0 mg/ml).



Γράφημα 9: Τιμές IC50 της πρωτεΐνης βοδινού (beef protein), της σόγιας (soy), της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey) και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey).

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια σημαντική αιτία οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσει σε θραύση του DNA και μεταλλάξεις γονιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστό ότι είναι προϊόν του φυσιολογικού μεταβολισμού. Όταν το οξυγόνο παρέχεται σε περίσσεια ή η μείωση του είναι ανεπαρκής, δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) όπως ανιόντα υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) και υπεροξειδίου του υδρογόνου παράγονται. Οι ROS εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας δραστηριότητες του οργανισμού όπως φαγοκυττάρωση, ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενδοκυτταρική σηματοδότηση και σύνθεση βιολογικά δραστικών ενώσεων (Miquel and Romano-Bosca, 2004). Από την άλλη όμως οι ROS έχουν εμπλακεί σε διάφορες ασθένειες όπως καρκινογένεση, ελονοσία, καρδιακές παθήσεις, αρτηριοσκλήρωση, διαβήτη και πολλές ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση (Honda et al., 2004; Uchida, 2000). Ο ρόλος των ROS στην αιτιολογία και την εξέλιξη αρκετών κλινικών συμπτωμάτων έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά μπορούν να είναι ωφέλιμα σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Παρόλα αυτά όλοι οι οργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου έχουν έχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που προστατεύουν από οξειδωτική βλάβη και επιδιορθώνουν κατεστραμμένα μόρια (Espin et al., 2000; Greenwald et al., 2001; Scalbert and Williamson, 2000). Ωστόσο, οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ανεπαρκείς και η παροχή αντιοξειδωτικών μέσω διατροφικών συστατικών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίσαμε την αντιοξειδωτική δράση αγελαδινής και αιγοπρόβειας πρωτεΐνης τυρογάλακτος, σόγιας και εκχυλίσματος μοσχαρίσιου κρέατος. Χρησιμοποιήθηκαν 5 πειραματικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των αναφερόμενων πρωτεϊνών (Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας $\text{DPPH}\cdot$, πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $\text{ABTS}^{+\cdot}$, πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $\text{OH}\cdot$, πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και πρωτόκολλο εκτίμησης αναγωγικής δύναμης).

Κατά την πρώτη μέθοδο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•], η πρωτεΐνη εκχυλίσματος μοσχαρίσιου κρέατος (beef protein) εμφάνισε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες, οι οποίες και αυτές εμφάνισαν αντιοξειδωτική ικανότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•] είναι η ακόλουθη: Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=8,2mg/ml**) < Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=3,1mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**IC₅₀=2,2mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**IC₅₀=1,3mg/ml**). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•] από την πρωτεΐνη τυρογάλακτος μελετήθηκε και από τους Kamau et al., 2010. Εξέτασαν την επίδραση υδρολυμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε συγκέντρωση 1 mg/ml έναντι στη ρίζα DPPH[•]. Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ανέστειλε τη ρίζα κατά ~ 70%. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη επειδή ήταν υδρολυμένη εμφάνισε ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης από τη δική μας. Επίσης έχει μελετηθεί και η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•] από υδρολυμένα κλάσματα πρωτεΐνης σόγιας, τα οποία εμφάνισαν ανασταλτική δράση που κυμαινόταν από 13,5-26,1% (Zhang et al., 2009).

Κατά την εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εκχυλίσματος μοσχαρίσιου κρέατος εμφάνισε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Η σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+} είναι η ακόλουθη: Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=4,1mg/ml**) < Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=3,9 mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**IC₅₀=3,1mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**IC₅₀=0,6 mg/ml**).

Κατά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH[•] τα αποτελέσματα ήταν ίδια με την προηγούμενη μέθοδο με μόνη διαφορά στις συγκεντρώσεις που έδρασε η κάθε πρωτεΐνη. Η σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] είναι η ακόλουθη: Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=1,8mg/ml**) < Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**IC₅₀=1,7mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**IC₅₀=1,1mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**IC₅₀=0,85mg/ml**). Βλέπουμε ότι σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους οι πρωτεΐνες έδρασαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (ειδικά οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος) κάτι που μας οδηγεί να συμπεράνουμε ότι οι πρωτεΐνες ήταν ιδιαίτερα δραστικές απέναντι στη ρίζα του υδροξυλίου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Όσον αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), μόνο η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε ανασταλτική δράση απέναντι στη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ με τιμή **IC₅₀= 2,5 mg/ml**. Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, εμφανίζεται αυξημένη ανασταλτική δράση. Παρατηρήσαμε ότι ενώ στις υπόλοιπες μεθόδους το IC₅₀ της κυμαινόταν μεταξύ 0,6-0,9 mg/ml, στη μέθοδο εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) το IC₅₀ της αυξήθηκε κατά 3-4 φορές.

Τέλος, όσον αφορά την εκτίμηση της αναγωγικής δύναμης κάθε πρωτεΐνης η σειρά αυξανόμενης αναγωγικής δύναμης είναι η ακόλουθη: Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**RP_{0.5AU}=4,8 mg/ml**) < Πρωτεΐνη σόγιας (**RP_{0.5AU}=4,6 mg/ml**) < Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**RP_{0.5AU}=1,3 mg/ml**) < Πρωτεΐνη βοδινού (**RP_{0.5AU}=0,9 mg/ml**).

Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ασκεί τις ευεργετικές τις επιδράσεις είναι η ενδοκυτταρική μετατροπή του αμινοξέος κυστεΐνη σε γλουταθειόνη. Έτσι, μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη αποτελεί ένα αποτελεσματικό σύστημα παροχής κυστεΐνης για την αναπλήρωση της γλουταθειόνης (Bounous et al., 2003). Ο μηχανισμός με τον οποίο η σόγια ασκεί τα οφέλη της φαίνεται να συνδέεται με το περιεχόμενο της σε ισοφλαβόνες, μία σημαντική κατηγορία βιοδραστικών φυτοοιστρογόνων.

Συμπερασματικά, ξεκάθαρα βλέπουμε ότι όλες οι πρωτεΐνες εμφανίζουν, σε φυσιολογικές για τον οργανισμό συγκεντρώσεις, αντιοξειδωτικό χαρακτήρα απέναντι σε αρκετές ελεύθερες ρίζες και επιδεικνύουν και ικανότητες αναγωγής με σαφώς ισχυρότερη αντιοξειδωτική πρωτεΐνη αυτή του εκχυλίσματος βοδινού κρέατος.

6.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•].

Η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης) (900μL), 100 μM ρίζας DPPH[•] (50μL) και η πρωτεΐνη (50μL) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε

θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Υπολογισμοί

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ radical scavenging activity} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

6.2 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}.

Η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400 μL H₂O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H₂O₂ (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επιάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μL της πρωτεΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Υπολογισμοί

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} \text{ radical scavenging activity} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

6.3 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH•.

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (OH•) έγινε με τη μέθοδο των Chung et al., 1997.

Εβδομήντα πέντε μL πρωτεΐνης προστέθηκαν σε 450 μl sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), 150 μl 2-deoxyribose (10 mM), 150 μl FeSO₄- EDTA (10 mM), 525 μl H₂O και 150 μl H₂O₂ (10 mM) και ακολούθησε επώαση για 4 h στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 750 μl TCA 2.8 % και 750 μl TBA 1 % και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 10 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm.

Υπολογισμοί

$$\% \text{ hydroxyl radical scavenging activity} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

6.4 Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004.

Σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστέθηκαν 0.5 ml NBT (300μM), 0.5 ml NADH (468μM) και 250 μl πρωτεΐνης. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 0.5 ml PMS (60μM) στο μίγμα. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm.

Υπολογισμοί

$$\% \text{ superoxide radical scavenging activity} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

6.5 Πρωτόκολλο εκτίμησης αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

Η πρωτεΐνη μας διαλύθηκε σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6). Προστέθηκαν 2.5 ml από το διάλυμα του δείγματος μας σε 2.5 ml potassium ferricyanide 1% και τα δείγματα μας επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2.5 ml TCA 10% και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά. Στο υπερκείμενο (2.5 ml) προστέθηκαν 2.5 ml απιονισμένου νερού και 0.5 ml ferric chloride 0.1 % και τα αφήσαμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm.

7 Βιβλιογραφία

1. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987 Apr 25;262(12):5592-5.
2. Ames B, Cathcart R, Schwiers E and Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. NatL Acad. Sci.* 1981; 78, pp.6858-6862.
3. Arnao MB ,Hernández-Ruiz J, Hiner AN, García-Cánovas F, Acosta M. Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochem J.* 2001 February 15; 354(Pt 1): 107–114.
4. Baruchel S, Wainberg MA. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *J Leukoc Biol.* 1992 Jul;52(1):111-4.
5. Beydemir G. , S. Elmastas, M., & Kufrevioglu, O. I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393–400.
6. Boon E, Downs A and Marcey D. Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase. *Catalase Structural Tutorial Text* 2001. © David Marcey, 2001
7. Bounous G, Kongshavn PA. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr.* 1982 Sep;112(9):1747-55.
8. Bounous G, Kongshavn PA. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr.* 1985 Nov;115(11):1403
9. Bounous G, Molson JH (2003) The antioxidant system. *Anticancer Res* 23(2B):1411–1415

10. Buettner G. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, -Tocopherol, and Ascorbate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993

11. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 1997;6(4):391-7.

12. Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.

13. Chung, S. K.; Osawa, T.; Kawakishi, S. Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1997, 61, 118-123

14. Clausen MR, Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. Skibsted LH, Stagsted J. *J Agric Food Chem.* 2009 Apr 8;57(7):2912-9. doi: 10.1021

15. Crinnion WJ. Environmental medicine, part 2 health effects of and protection from ubiquitous airborne solvent exposure. *Altern Med Rev* 2000;5:133-143.

16. Crinnion WJ. Environmental medicine, part 4: pesticides – biologically persistent and ubiquitous toxins. *Altern Med Rev* 2000;5:432-447

17. Cutler R. *Interdiscip. Top. Gerontol* 1976; 9: 83-133.

18. Dario Elia, Krisztia'n Stadler, Viktoria Horvath, Judit Jakus Effect of soy- and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *Eur J Nutr.* 2006 Aug;45(5):259-66. Epub 2006 Mar 30.

19. Daenzer M, Petzke KJ, Bequette BJ, Metges CC. Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J Nutr.* 2001 Jul;131(7):1965-72.

20. Devasagayam TPA , JC Tilak, KK Bloor, Ketaki S Sane, Saroj S Ghaskadbi, RD Lele. Free Radicals and Antioxidants in Human Health:Current Status and Future Prospects, J Assoc Physicians India. 2004 Oct;52:794-804.
21. Duthie G. Determination of activity of antioxidants in human subjects. Proceedings of the Nutrition Society 1999, 58: 1015-1024.
22. Elliott RH, Strunin L. Hepatotoxicity of volatile anaesthetics.Br J Anaesth. 1993 Mar;70(3):339-48. Review.
23. Espin JC, Soler-rivas C, Wichers HJ (2000). Characterization of the total free radical scavenging capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. J. Agric. Food Chem., 48: 648-656.
24. Esposito F, Russo L, Chirico G, Ammendola R, Russo T and Cimino F. Regulation of p21waf1/cip1 expression by intracellular redox conditions. IUBMB Life. 2001; 52: 67–70.
25. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology.Br Med Bull. 1993 Jul;49(3):577-87. Review.
26. Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, Ann NY Acad Sci, 2000;899:1-14.
27. Gill HS.Korhonen H, Marnila P,. Milk immunoglobulins and complement factors. Br J Nutr. 2000 Nov;84 Suppl 1:S75-80. Review.
28. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In: Buttriss J, Saltmarsh M, eds. Functional Foods II--Claims and Evidence. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press. 2000; 82-90
29. Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR. Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 31;342(1):184-90. Epub 2006 Feb 3.

30. Gong SG, Hansen JM, Philbert M, Harris C. Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappa-b-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn.* 2002 Oct;225(2):186-94.
31. Greenwald P, Clifford CK, Miner JA (2001). Diet and cancer prevention. *Eur. J. Cancer*, 37: 948-965.
32. Guimont C, Marchall E, Girardet JM, Linden G. Biologically active factors in bovine milk and dairy byproducts: influence on cell culture. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997 Jun;37(4):393-410. Review.
33. Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükkuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 2004 Feb;90(2-3):205-15.
34. Gutteridge, 1995 *Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, Clinical Chemistry*, 1995,
35. Gutteridge, J. M. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.* 1984, 224, 761-767
36. Ha Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem* 2003;14:251-258
37. Hasler CM. The cardiovascular effects of soy products. *J Cardiovasc Nurs.* 2002 Jul;16(4):50-63; quiz 75-6.
38. Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
39. Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.

41. Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Engyclopedia of Life Sience
42. Honda, K., Casadesus, G., Paterson, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2004. Oxidative stress and redox iron in Alzheimer's disease. *Ann. New York Acad. Sci.* 1012, 179-182.
43. Hurst R, Bao Y, Ridley S, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. *Biochem J.* 1999 Mar 15;338 (Pt 3):723-8.
44. Jay R. Hoffman, Michael J. Falvo Protein-Which is the best USA, Review article, 01 September 2004
45. Jones Dean P. Radical-free biology of oxidative stress *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C849-C868, 2008.
46. Kawamukai M. Biosynthesis, Bioproduction and Novel Roles of Ubiquinone, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002; 94:511-517.
47. Keri Marshall, ND, MS Therapeutic Applications of Whey Protein *Alternative Medicine Review* ,Volume 9, Number 2 ,2004
48. Kussendrager KD, van Hooijdonk AC. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br J Nutr.* 2000 Nov;84 Suppl 1:S19-25. Review.
49. Linnane AW. Cellular coenzyme Q10 redox poise constitutes a major cell metabolic and gene regulatory system. *Biogerontology.* 2002;3(1-2):3-6.
50. Machnicki Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol* 1993;74:433-439.

51. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16: 577-586.
52. Messina Mark and Virginia Messina. The Role of Soy in Vegetarian Diets. Special Issue Vegetarian Nutrition, 6 August 2010
53. Marz R. *Medical Nutrition from Marz*, 2nd ed. Portland, OR: Omni Press; 2002
54. McCue Patrick, Shetty Kalidas. *Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review Food Biotechnology*, Second Edition, CRC Press 2005
55. Miquel J, Romano-Bosca A (2004). Oxidative stress and antioxidant diet supplementation in ageing, arterosclerotic and immune dysfunction processes. *ARS Pharm.*, 45(2): 91-109.
56. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Apr;84(4):407-12.
57. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. Department of Pharmacology, University of Leeds, U.K. *In Vivo*. 1999 May-Jun;13(3):295-309.
60. Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, Terao J. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr.* 2002 Jul;132(7):1956-61
61. Nogueira C, Zeni G and Rocha J. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 2004; 104: 6255–6285.
62. Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinari T, Monden Y. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Nov 30;157(1):183-9.
63. Paiva S and Russell R. β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 1999; 18:426-433.

64. Parke AL. Gastrointestinal disorders and rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 1991 Feb;3(1):160-5. Review.
65. Peisker M. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. *Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food.* Zaragoza : CIHEAM, 2001. Conference of Feed Manufacturers of the Mediterranean, 2000/03/22-24
66. Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Spik G. *Eur J Biochem.* Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. 1991 Feb 26;196(1):177-84.
67. Potter SM, Teixeira SR, Weigel R, Hannum S, Erdman JW Jr, Hasler CM. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.* 2000 May;71(5):1077-84.
68. Rahman I, S K Biswas *Antioxidants, Enzymatic.* University of Rochester Medical Center, 2006 Elsevier Ltd.
69. Reid VE ,Hickey EJ, Raje RR, Gross SM, Ray SD. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jul 15;31(2):139-52.
70. Rimbach G, Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L., *Arch Tierernahr.* 1999;52(3):203-22. Review.
71. Rimbach G, Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. De Pascual-Teresa S, Ewins BA, Matsugo S, Uchida Y, Minihane AM, Turner R, VafeiAdou K, Weinberg PD. *Xenobiotica.* 2003 Sep;33(9):913-25.

72. Ron Kohen and Abraham Nyska. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification DOI: 10.1080/01926230290166724. *Toxicol Pathol* 2002 30: 620
73. Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130: 2073-2085.
74. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 2002 Dec;132(12):3577-84. Review.
75. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31.
76. Sies H, Stahl W, Sundquist A, Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995; 669, 7-20
77. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res.* 1998 Dec;40(3):426-32.
78. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10540-3.
79. Soriani M, Pietraforte D and Minetti M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 312: 180-8.
80. Sukkar SG, Bounous G (2004) The role of whey protein in antioxidant defense. *Rivista Italiana di Nutrizione Parenterale ed Enterale* 22:193–200
81. Thomas J, Maiorino M, Ursini F and Girotti W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane damaging lipid peroxidation; in situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J.Biol. Chem.* 1990; 265: 454-461.
82. Toyokuni S. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy.* 1998;11(2-3):147-54. Review.

83. Uchida, K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1685-1696.
84. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007; 39: 44-84
85. Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002;42:353-375
86. Wang SY, Yang KW, Hsu YT, Chang CL, Yang YC. The differential inhibitory effects of genistein on the growth of cervical cancer cells in vitro. *Neoplasma*. 2001;48(3):227-33.
87. Waring W. Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke, *Q. J. Med.* 2002; 95: 691-693.
88. Yen, G.C., Duh, P.D., 1994. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free Radical and Active Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.* 42, 629-632.
89. Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, and Guoyao Wu. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002;18:872– 879. ©Elsevier Science Inc. 2002
90. Σπανού Χρύσα, «Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα 2010
91. Κασμάς Σταμάτης, «Αντιοξειδωτική δράση φυτοθεραπευτικών in vitro και in vivo», Διπλωματική διατριβή, Α.Π.Θ. Τμήμα φαρμακευτικής, τομέας φαρμακογνωσίας και φαρμακολογίας, κατεύθυνση: φαρμακογνωσία-φυτικά προϊόντα.Θεσσαλονίκη 2008