



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ (ΝΕΦΡΟΣ,
ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ, ΣΤΟΜΑΧΟΣ, ΠΑΓΚΡΕΑΣ) ΑΠΟ ΝΕΑΡΑ ΧΟΙΡΙΔΙΑ
ΚΡΕΑΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΕΙΝΗ
ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ (WHEY)**

**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PIGLET TISSUES
(KIDNEY, LUNG, STOMACH, PANCREAS) AFTER ADMINISTRATION OF
FEED WITH WHEY PROTEIN**



ΣΚΑΠΕΡΔΑ ΖΩΗ-ΒΑΣΙΛΙΚΗ

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 - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών 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 όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο καθώς συνέβαλαν στα μέγιστα τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ιστορική Αναδρομή	9
1.2 Ελεύθερες Ρίζες.....	10
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)	13
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS).....	14
1.2.3 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας.....	15
1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα	18
1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων	21
1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών	22
1.6 Το Τυρόγαλα	22
1.6.1 Διαχείριση του τυρογάλακτος	24
1.7 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος	25
•β-λακτογλοβουλίνη	26
•α-λακταλβουμίνη.....	26
•Ανοσοσφαιρίνες	26
1.7.1 Μέθοδοι παραγωγής.....	26
<i>ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ WPC</i>	27
<i>Whey Protein Isolates (WPI)</i>	28
1.7.2 Αντιοξειδωτική δράση-πλεονεκτήματα.....	30
1.8 Γενικές Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια	31

1.8.1 Εγκυμοσύνη Των Χοίρων	32
1.8.2 Ασθένειες Που Προσβάλλουν Τους Χοίρους	33
1.8.3 Εκτροφή Χοίρων	33
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	35
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
3.1 Γενικά.....	36
3.2 Περιγραφή Σιτηρεσίου	38
3.2.1 Παρασκευή Βιολειτουργικών Ζωοτροφών	38
3.2.2 Χαρακτηριστικά Ενσιρώματος	39
3.2.3 Παρασκευή Ενσιρώματος Καλαμποκιού	39
3.2.4 Σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων	40
3.3 Ιστοληψία.....	41
3.3.2 Ομογενοποίηση ιστών	42
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	43
3.4.1 Γενικά.....	43
3.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης	44
3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης	47
3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).....	49
3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	52
3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	54
3.4.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	57
3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	57
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
4.1 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας) στους χοίρους	58
4.1.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον νεφρό	58
4.1.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον νεφρό.....	59

4.1.3 Επίπεδα των TBARS στον νεφρό	60
4.1.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρό	61
4.1.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον νεφρό	63
4.1.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον πνεύμονα	64
4.1.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον πνεύμονα.....	65
4.1.8 Επίπεδα των TBARS στον πνεύμονα.....	66
4.1.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνεύμονα	67
4.1.10 Επίπεδα της TAC στον πνεύμονα	68
4.1.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον στόμαχο	69
4.1.12 Επίπεδα Καταλάσης στον στόμαχο	70
4.1.13 Επίπεδα των TBARS στον στόμαχο	71
4.1.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στόμαχο	72
4.1.15 Επίπεδα της TAC στον στόμαχο.....	73
4.1.16 Επίπεδα Γλουταθειόνης στο πάγκρεας	74
4.1.17 Επίπεδα Καταλάσης στο πάγκρεας	75
4.1.18 Επίπεδα των TBARS στο πάγκρεας	76
4.1.19 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πάγκρεας	77
4.1.20 Επίπεδα της TAC στο πάγκρεας.....	78
4.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας) των χοίρων	80
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε εκτροφή οικόσιτων χοίρων που προήλθαν από τη διασταύρωση Landrace με Large White – Duroc – Pietrain και διεξήχθησαν 4 ιστοληψίες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά τους στάδια, ώστε να γίνει έλεγχος της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης στο νεφρό, στον πνεύμονα, στον στόμαχο και στο πάγκρεας. Οι πρώτες 2 ιστοληψίες διεξήχθησαν κατά την πρόωρη ηλικία (2^η και 20^η μέρα), περίοδο κατά την οποία καταναλώναν μόνο το μητρικό γάλα. Οι άλλες 2 ιστοληψίες αφορούσαν τις περιόδους μερικού (35^η μέρα) και πλήρους απογαλακτισμού (50^η μέρα), κατά τις οποίες τα εναπομείναντα χοιρίδια ήταν χωρισμένα σε δύο ομάδες ανάλογα με το πειραματικό σιτηρέσιο που καταναλώναν. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, ενώ η δεύτερη την ομάδα whey, η τροφή της οποίας περιείχε πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε σκόνη. 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 στους προαναφερθέντες ιστούς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα GSH, στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control στον νεφρικό ιστό (71,79% στις 50 ημέρες), στον πνεύμονα (52% στις 35 ημέρες), στον στόμαχο (32,25% στις 35 ημέρες) και στο πάγκρεας (197,71% στις 35 ημέρες και 169,10% στις 50 ημέρες), ενώ παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα GSH στον στόμαχο (41,83% στις 50 ημέρες). Τα επίπεδα της CAT αυξήθηκαν στον πνεύμονα (39,76% στις 50 ημέρες) και στο πάγκρεας (149,10% στις 50 ημέρες) ενώ μειώθηκαν στον στόμαχο (26,54% στις 35 ημέρες). Τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν, στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control, στο πάγκρεας (29,33% στις 35 ημέρες και 60,38% στις 50 ημέρες). Τα TBARS μειώθηκαν στον στόμαχο (50,14% στις 50 ημέρες) και στο πάγκρεας (46,99% στις 50 ημέρες) ενώ τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώθηκαν στον στόμαχο (61,21% στις 50 ημέρες), στο πάγκρεας (60,31% στις 50 ημέρες) και στον νεφρό (39,84% στις 50 ημέρες). 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 ορού γάλακτος 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 and 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 in blood and tissues: reduced glutathione (GSH), catalase activity (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyls (CARB). According to the results, GSH levels were increased in whey group than in control group (71,79% at 50d) in kidney tissue, in lung tissue (52% at 35d), in stomach (32,25% at 35d) and in pancreas (197,71% at 35d and 169,10% at 50d), while GSH levels were decreased in stomach tissue (41,83% at 50d). CAT levels were increased in lung tissue (39,76% at 50d) and in pancreas (149,10% at 50d) while they were decreased in stomach tissue (26,54% at 35d). TAC levels were increased in whey group than in control group (29,33% at 35d and 60,38 at 50d) in pancreas. TBARS were decreased in stomach tissue (50,14% at 50d) and in pancreas (46,99% at 50d) while protein carbonyls were decreased in stomach tissue (61,21% at 50d), in pancreas (60,31% at 50d) and in kidney tissue (39,84% at 50d). 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 Ιστορική Αναδρομή

Το οξυγόνο (O_2) είναι ένα πολύ κρίσιμο και βασικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής και χρησιμοποιείται στη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια, οξειδώνοντας τις τροφές. Το οξυγόνο ανακαλύφθηκε στην Ουψάλα της Σουηδίας για πρώτη φορά από τον Σουηδό φαρμακοποιό και χημικό Καρλ Βίλχελμ Σέελε (Carl Wilhelm Scheele, 1742 – 1786) ο οποίος είχε παραγάγει αέριο οξυγόνο με θέρμανση οξειδίου του υδραργύρου και διάφορα νιτρικά άλατα περίπου το 1772. Ο Σέελε ονόμασε το αέριο "φωτιά του αέρα" επειδή ήταν η μόνη ουσία που υποστήριζε την καύση. Ωστόσο, αν και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για όλες τις μορφές αερόβιας ζωής η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη χορήγησή του μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα βλαπτική για τους οργανισμούς. Το O_2 κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία, κάτι που χαρακτηρίζεται ως «βιοχημικό παράδοξο». Αυτό πρώτη φορά παρατηρήθηκε από τον Priestley το 1775, ο οποίος ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershan et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και την περιέγραψε ως το κακό περιεχόμενο του κουτιού της Πανδώρας. Αργότερα έθεσε ως αξίωμα ότι αυτά τα συστατικά έχουν ρόλο στην γήρανση μέσω της πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 από τους McCord και Fridovich σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των

ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές (Valko et al. 2007). Ο όρος **οξειδωτικό στρες** ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.» (Sies, H., et al., 1985).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το 1954 στο επιστημονικό περιοδικό Science προτάθηκε για πρώτη φορά ότι, ο παράγοντας που ενοποιούσε τα αποτελέσματα της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με αυτά της «δηλητηρίασης» από το O₂, ήταν αυτό που αποκαλούμε ελεύθερες ρίζες (ROS).

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, δημιουργούν ζεύγη με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα συζευγμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά

σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται **οξειδοαναγωγικές** (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο (π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).

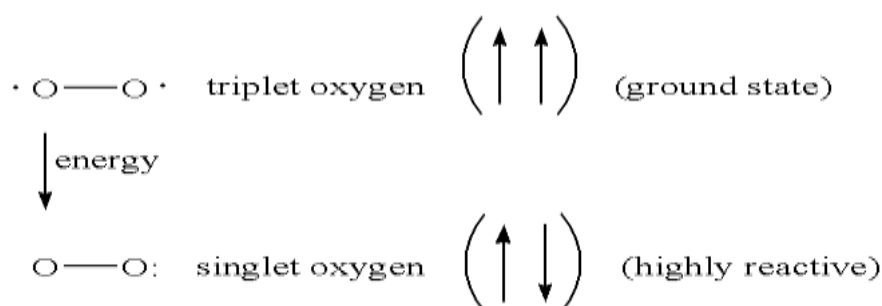
Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1990). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ.. Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge 1990). Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επί μακρόν. Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι

είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίες οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών.

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

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το οξυγόνο μπορεί να γίνει τοξικό. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*tripletstate*) δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singletstate*) και συμβολίζεται με $*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών. Δηλαδή, είτε μέσω απορρόφησης της επαρκούς ενέργειας για την αναστροφή του spin σε ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είτε μέσω μονοσθενής αναγωγής. Έτσι, θα προκύψει ο σχηματισμός οξυγόνου μονής κατάστασης, του οποίου τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλα spin, και συνεπώς μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1: Οξυγόνο μονής και τριπλής κατάστασης.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell, 2001). Συνολικά, όλα

τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Gutteridge, 1995), ενώ αντίστοιχα όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν άζωτο ονομάζονται δραστικά είδη αζώτου (ΔΕΑ).

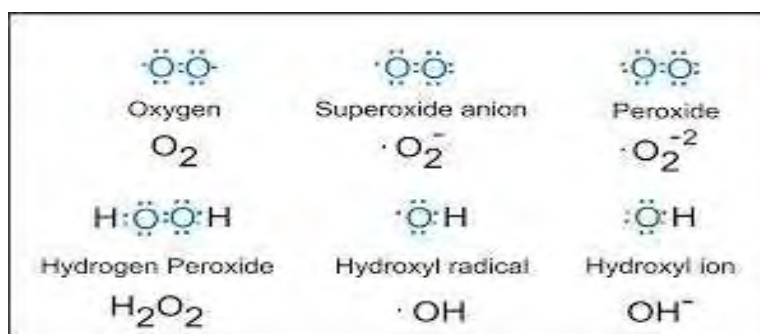
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής. Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπών ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξείδωση και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου. Αυτά είναι η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\cdot}), το O_2 απλής κατάστασης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$). Το $O_2^{\cdot-}$ και το OH^{\cdot} είναι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες, ενώ το H_2O_2 αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα, η σημασία του για την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού είναι κρίσιμη, καθώς από τη μία αποτελεί υπόστρωμα για την παραγωγή άλλων ενδιάμεσων μορίων με οξειδοαναγωγικό δυναμικό και από την άλλη συμμετέχει στις διαβιβαστικές οδούς ορμονών και παραγόντων ανάπτυξης οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (redox sensitive genes). (Παπαγαλάνης 2014).

Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος. (Παπαγαλάνης 2014).

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. Η παρουσία

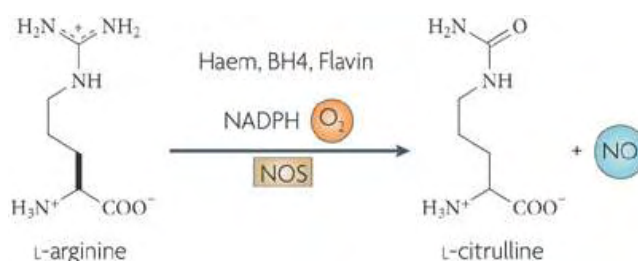
ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστηριότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova et al., 2010).



Εικόνα 2: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

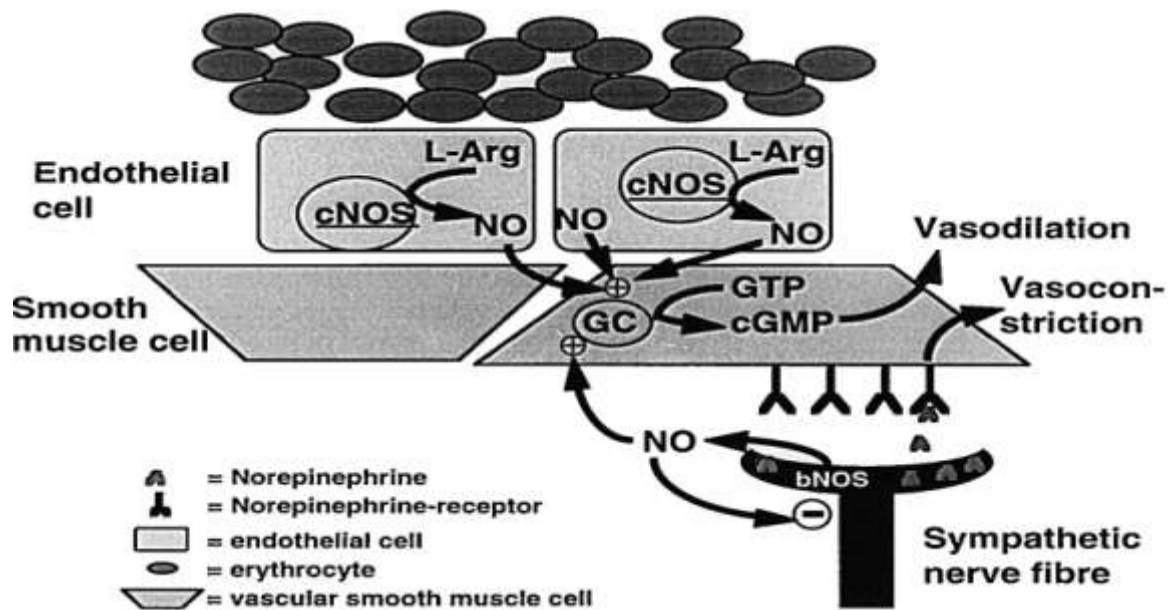
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O_2), με το υπεροξείδιο (O_2^-), με την αιμοσφαιρίνη και γενικά με πρωτεΐνες που περιέχουν συναθροίσεις (clusters) ομάδων με δεσμούς δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με θείο (iron-sulfur centers) καθώς και με άλλες ρίζες πρωτεϊνών και λιπών. Τα παραγόμενα προϊόντα και η τροποποίηση διαφόρων βιομορίων από αυτά, έχουν ουσιαστική συμμετοχή στο μεταβολισμό και στο επίπεδο του οξειδωτικού στρες του οργανισμού. (Παπαγαλάνης 2014)



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 3: Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).



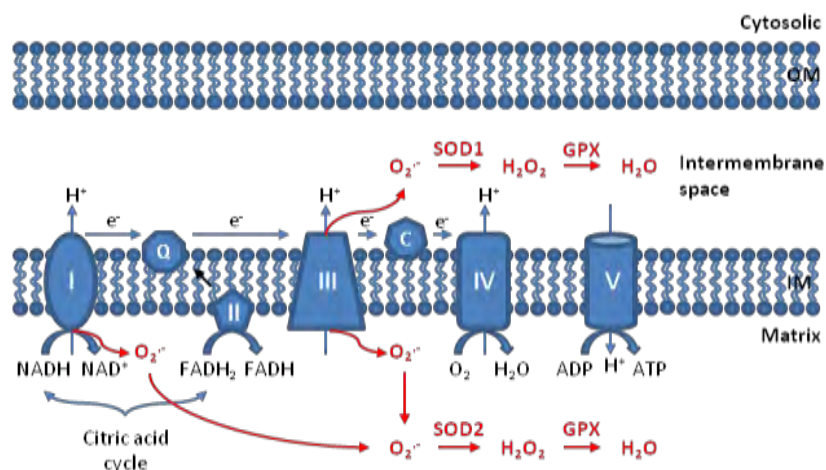
Εικόνα 4: Επίδραση του NO στη χάλαση του αγγείου.

1.2.3 Πώς Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας

Όπως είναι ευρέως γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Αρχικά, το οξυγόνο που εισέρχεται στον οργανισμό με την αναπνοή, μεταφέρεται μέσω του αίματος στα κύτταρα. Το 95% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, η οποία αποθηκεύεται υπό τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας στο μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξείδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια παράγονται διάφορα προϊόντα, ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο. Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες:

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγής

κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου.



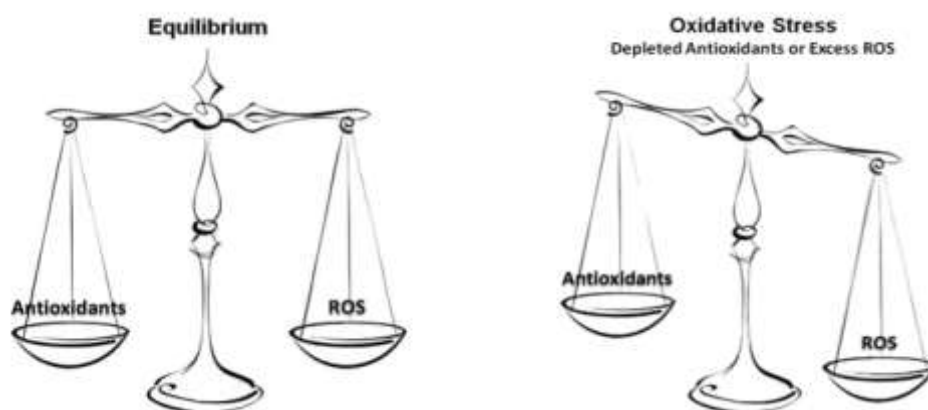
Εικόνα 5: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

B) Το υπόλοιπο 5% του εισερχόμενου οξυγόνου που χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανδινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 και το OH^{\bullet} .

(ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξειδίο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

1.3 Οξειδωτικό Στρες - Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του **οξειδωτικού στρες**. (Pisoschi & Pop 2015) Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάσταση, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 7: Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

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

- α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
- β) Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
- γ) Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
- δ) Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

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

Ειδικότερα, τα **ενδογενή αντιοξειδωτικά**, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σ' ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελευθέρων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σ' αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελευθέρων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη.

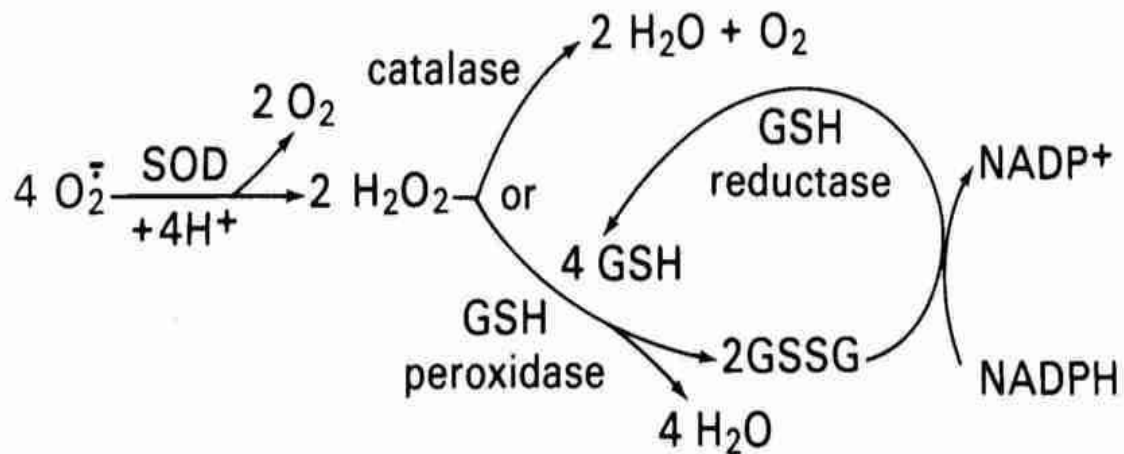
Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα **εξωγενή αντιοξειδωτικά** είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.

Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10.



Εικόνα 8: Τρόπος δράσης μια αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό της αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 9: Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση. Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστο αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηρωσκλήρωση μέσω οξείδωσης της LDL χοληστερίνης. Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες Στην Υγεία Των Ζώων

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι στα κτηνοτροφικά ζώα το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις (σήψη, μαστίτιδα, εντερίτιδα, πνευμονία, παθήσεις των αρθρώσεων, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού) στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με τη ζωική παραγωγή και την ευζωία (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Για παράδειγμα, κοινές ασθένειες όπως, πνευμονία (Lauritzen et al., 2003), εντερίτιδα (Miller et al., 1993), πυρετός (Kataria 2012b), σήψη στους χοίρους (Basu and Eriksson, 2001) και υποτροπιάζουσα

απόφραξη και φλεγμονή της αναπνευστικής οδού στα άλογα (Deaton et al., 2004a, 2005), προκαλούνται από διαταραχές της αντιοξειδωτικής ομοιόστασης των ζώων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μαστίτιδα (Weiss et al., 2004), πανώλη (*Peste des petits ruminants*) (PPR) (Kataria A. K 2012a), πνευμονία (Wessely-Szponder et al., 2004) και μολύνσεις από παράσιτα (Celi, 2010) προκαλούνται στα μηρυκαστικά λόγω οξειδωτικού στρες, ενώ πολλές έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να προστατεύσει τα ζώα από τέτοιες ασθένειες ή να μειώσει τα κλινικά συμπτώματά τους (Chaiyotwittayakan et al., 2004; Bouchard et al., 1999; Hogan et al., 1992; Deaton et al., 2004b).

Έτσι, θεωρείται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική και χαμηλού κόστους παρέμβαση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων των κτηνοτροφικών ζώων στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Lykkesfeldt and Svendsen 2007). Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Jain and Flora, 2012; Chan et al., 2013; Campbell et al., 2013; Vander Meulen, 2010) έδειξαν ότι τα πολύ νεαρά ζώα λόγω παραγόντων στρες (στρες απογαλακτισμού) έχουν μειωμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε σύγκριση με τα ενήλικα ζώα και έτσι στα νεαρά ζώα είναι ακόμα πιο απαραίτητη η χορήγηση αντιοξειδωτικών για προστασία από ασθένειες.

1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις πολυάριθμες αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως κάποιες φορές είναι αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.

1.6 Το Τυρόγαλα

Το τυρόγαλα αποτελεί υποπροϊόν της γαλακτοβιομηχανίας, και πιο συγκεκριμένα, της τυροκομίας. Σύμφωνα με την απόφαση 97/80/EK το τυρόγαλα,

ή ορός γάλακτος, ορίζεται ως το υπολειμματικό προϊόν που παράγεται κατά την παρασκευή τυριού ή καζεΐνης. Το τυρόγαλα περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό της λακτόζης και των οροπρωτεϊνών του γάλακτος, και επίσης διάφορα άλατα. Η αναλογία των συστατικών του κυμαίνεται ανάλογα με το είδος του γάλακτος και το είδος του τυριού που παρασκευάζεται (Μάντης, 2000). Μερικά από τα θρεπτικά που περιέχονται στο τυρόγαλα είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, βιταμίνες και λακτόζη, η οποία είναι και η πιο άφθονη (4,5-5% w/v) (Guimarães et al., 2010). Γενικά το τυρόγαλα από πρόβειο γάλα αναμένεται να έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συνολικών στερεών από το αγελαδινό (Μάντης, 2000). Το τυρόγαλα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Κατά κανόνα, η παρασκευή 1 kg τυριού συνεπάγεται την παραγωγή περίπου 9 L τυρογάλακτος (Kosikowski, 1979; Guimarães et al., 2010). Σε ετήσια βάση, η παγκόσμια παραγωγή τυρογάλακτος ξεπερνά τους 160 εκατομμύρια τόνους, ενώ παρατηρείται ετήσιος ρυθμός αύξησης της τάξης του 1-2% (OECD-FAO, 2008). Το τυρόγαλα διαθέτει ισχυρό ρυπαντικό φορτίο. Κυρίως λόγω του γαλακτικού οξέος και των οργανικών συστατικών του παρουσιάζει υψηλό BOD και όταν απορρίπτεται σε υδροφορείς δημιουργεί σημαντικές επιπτώσεις στον αντίστοιχο βιότοπο. Αποτελεί επομένως, ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Από την άλλη όμως, όπως προαναφέρθηκε, το τυρόγαλα διατηρεί πολλά από τα θρεπτικά στοιχεία του γάλακτος και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολλών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, επιτρέποντας έτσι στην βιομηχανία να το αντιμετωπίσει σαν πόρο, και όχι σαν απόβλητο.



Εικόνα 10. Επεξεργασία και ρύπανση υδρόβιου περιβάλλοντος από την απόρριψη τυρογάλακτος

1.6.1 Διαχείριση του τυρογάλακτος

Η διαχείριση του τυρογάλακτος αποτελεί εδώ και χρόνια πρόκληση για τη γαλακτοβιομηχανία. Η αύξηση της παραγωγής του τυριού είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση και του όγκου του παραγόμενου τυρογάλακτος, το οποίο συνήθως διατίθονταν ακατέργαστο σε γειτονικά ρέματα (για αυτό άλλωστε παρατηρήθηκε και η κατασκευή των αντίστοιχων τυροκομικών μονάδων κοντά σε υδροφορείς), με αποτέλεσμα τη σοβαρότατη ρύπανση των υδάτων. Άλλες παλαιότερες μέθοδοι διαχείρισης του τυρογάλακτος αφορούσαν στην εφαρμογή του τυρογάλακτος στο έδαφος, την τροφοδοσία των μηρυκαστικών, την οξείδωση σε δεξαμενές αερόβιας κατεργασίας (lagoons), ή εναλλακτικά, τη διάθεση στο δίκτυο του δημοτικού βιολογικού καθαρισμού. Με τις παραπάνω μεθόδους, όμως, δεν επιτυγχάνονταν η αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών του τυρογάλακτος, ενώ παράλληλα υψηλά κόστη βάρυναν την γαλακτοβιομηχανία λόγω κυρίως του υψηλού κόστους μεταφοράς, ή συνέβαινε σημαντική επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Επιπλέον, σήμερα, οι κανονισμοί απαγορεύουν τη διάθεση του τυρογάλακτος στους υδροφορείς, αλλά ακόμα και στο δίκτυο του βιολογικού καθαρισμού λόγω της σημαντικής επιβάρυνσης της λειτουργίας του τελευταίου εξαιτίας του υψηλού ρυπαντικού φορτίου του τυρογάλακτος. Προκειμένου λοιπόν να αναπτυχθούν ολοκληρωμένες λύσεις για το πρόβλημα του τυρογάλακτος, θα πρέπει να αντιμετωπιστεί ως πόρος, και όχι ως λύμα, για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Περίπου ένα ποσοστό της τάξης του 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυρογάλακτος μετατρέπεται σε διάφορα προϊόντα διατροφής, με πιο κοινό προϊόν τη σκόνη τυρογάλακτος, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή, αλλά και ως συστατικό ανθρώπινων τροφίμων (ανάλογα με την ποιότητα της), όπως για παράδειγμα παγωτών, σαλτσών, προψημένων προϊόντων κ.α. Ένα άλλο σημαντικό τμήμα του τυρογάλακτος χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολύτιμων προϊόντων με ζύμωση. Τέτοια προϊόντα είναι η αιθανόλη, το βιοαέριο, οργανικά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, ένζυμα, κ.α., τα οποία παράγονται με ζύμωση της λακτόζης του τυρογάλακτος (Μάντης, 2000; Guimarães et al., 2010)

1.7 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

Το γάλα περιέχει εκατοντάδες είδη πρωτεϊνών, τις περισσότερες σε πολύ μικρές ποσότητες. Οι πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις χημικές ή φυσικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές τους λειτουργίες. Παραδοσιακά οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονταν στις καζεΐνες, τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος και τις δευτερεύοντες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που απαντούν στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων και τα ένζυμα ανήκουν στην ομάδα των δευτερευόντων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνη του τυρογάλακτος είναι ένας όρος που συχνά χρησιμοποιείται για τις πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος, αλλά τεχνικά περιλαμβάνει μόνο τις πρωτεΐνες εκείνες που είναι παρούσες στο τυρόγαλα το οποίο προκύπτει κατά την διαδικασία παρασκευής τυριού. Όταν η καζεΐνη απομακρυνθεί από το αποβουτυρωμένο γάλα με την επίδραση ανόργανων οξέων, αυτό που απομένει είναι ένα διάλυμα της ομάδας των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι πολύ όμοιες με τις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος για αυτό το λόγο και συχνά οι δυο όροι συγχέονται.

Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος αποτελούν περίπου το 20% του πρωτεϊνικού κλάσματος του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής είναι πολύ διαλυτές και διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- 50 % β-λακτογλοβουλίνη (β-Lg)
- 20 % α – λακταλβουμίνη (α – La)
- 10 % Αλβουμίνη πλάσματος (BSA)
- 10 % Ανοσοσφαιρίνες (Ig)

Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος γενικά, και συγκεκριμένα η α-λακταλβουμίνη έχουν υψηλή βιολογική αξία. Η σύνθεση των αμινοξέων τους είναι πολύ κοντά σε αυτή που θεωρείται ως βέλτιστη από άποψη βιολογικής αξίας. Παράγωγα του ορού του γάλακτος χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Οι πρωτεΐνες του ορού μετουσιώνονται κατά την θέρμανση με συνέπεια τη συσσωμάτωσή τους κυρίως με τα καζεϊνικά μικκύλια. Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος σε βιομηχανική κλίμακα απομονώνονται με τεχνολογίες μεμβρανών.

•β-λακτογλοβουλίνη

Η πρωτεΐνη αυτή απαντά μόνο στα οπληφόρα ζώα και είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος των αγελάδων. Με την θέρμανση του γάλακτος στους 60 °C, ξεκινά η μετουσίωση των πρωτεϊνών του κατά την οποία η αντίδραση των θειούχων αμινοξέων της β-λακτογλοβουλίνης παίζει εξέχοντα ρόλο. Σε υψηλές θερμοκρασίες ελευθερώνονται θειούχες ενώσεις οι οποίες είναι κατεξοχήν υπεύθυνες για την οσμή και γεύση του θερμασμένου γάλακτος.

•α-λακταλβουμίνη

Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως η χαρακτηριστική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Απαντά στο γάλα όλων των θηλαστικών και παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση της λακτόζης (γαλακτοσάκχαρο).

•Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του νεογγένητου ζώου (ή ανθρώπινου βρέφους) ενάντια σε βακτήρια και ασθένειες.

1.7.1 Μέθοδοι παραγωγής

Εμπορικά οι πρωτεΐνες ορού ανάλογα με τον βαθμό συμπύκνωσης τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες :

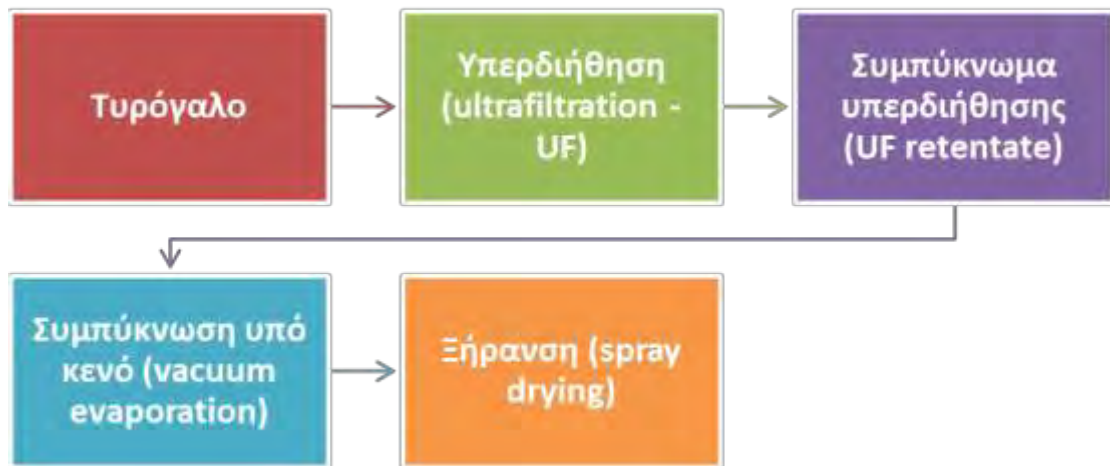
A) *Whey Protein Concentrate (WPC)*, συμπυκνωμένες πρωτεΐνες ορού με πρωτεϊνικό περιεχόμενο από 35 % - 85 %.

B) *Whey Protein Isolates (WPI)* με πρωτεϊνικό περιεχόμενο μεγαλύτερο του 90%

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει και μια νέα κατηγορία πρωτεϊνών ορού γάλακτος οι οποίες ονομάζονται *microparticulated whey proteins*. Στην πραγματικότητα είναι συνήθως WPC 35 ή WPC 55 οι οποίες έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία που ονομάζεται *microparticulation* με σκοπό την παραγωγή συσσωματωμάτων πρωτεϊνών της τάξης του 0,1 – 3 μm. Το χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι ότι χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα λιπαρών (*fat replacers*) καθώς δίνουν μια κρεμώδη αίσθηση όμοια με αυτή του λίπους.

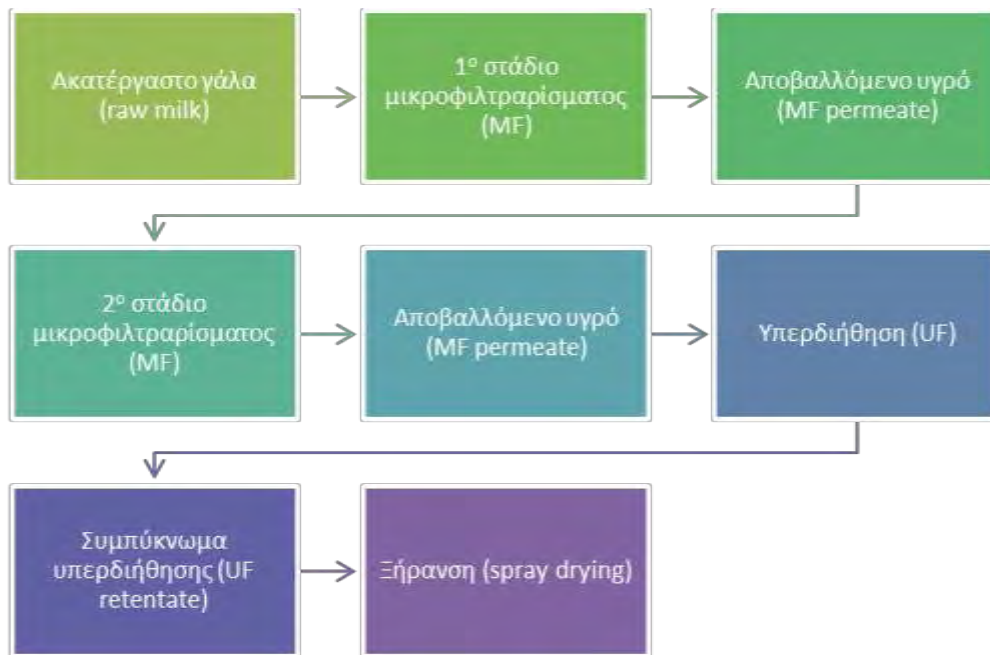
ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ WPC

Ο κύριος εμπορικός τρόπος παραγωγής αυτών χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη το τυρόγαλο και γίνεται με την μέθοδο της υπερδιήθησης (φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών) όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα παραγωγής (εικόνα 14)



Εικόνα 14. Μέθοδος παραγωγής WPC

Χάρη στην πρόοδο της τεχνολογίας στον τομέα του φιλτραρίσματος με μεμβράνες υπάρχει πλέον και νέος τρόπος παραγωγής WPC με πρώτη ύλη το γάλα αντί το τυρόγαλο. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες είναι γνωστές ως native whey protein concentrate (NWPC) και η διαδικασία παραγωγής γίνεται με χρήση του μικροφιλτραρίσματος όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα ροής (εικόνα 15)



Εικόνα 15. Μέθοδος παραγωγής NWPC

Οι NWPC διαφέρουν από τις WPC στο ότι το μόριο τους δεν έχει υποστεί μετουσίωση όπως επίσης ότι δεν περιέχουν το καζεινομακροπεπτίδιο που παράγεται κατά την τυροκόμηση.

Οι τεχνολογικές ιδιότητες των συμπυκνωμένων πρωτεϊνών ορού είναι οι ακόλουθες:

- Εξαιρετική διαλυτότητα (Solubility)
- Αύξηση του ιξώδους (Viscosity)
- Δημιουργία Πηχτής (Gelation)
- Ενσωμάτωση Αέρα (Foaming)
- Γαλακτωματοποίηση (Emulsifying Capacity)
- Ικανότητα συγκράτησης νερού (Water Holding Capacity)

Whey Protein Isolates (WPI)

Υπάρχουν δύο τρόποι παραγωγής σε εμπορική κλίμακα και οι οποίοι δίνουν πρωτεΐνες με διακριτές φυσικές και διατροφικές ιδιότητες. Ειδικότερα εφαρμόζεται η

μέθοδος ανταλλαγής ιόντων (Ion Exchange) καθώς και αυτή του μικροφιλτραρίσματος (Microfiltration).

i. Ανταλλαγή ιόντων

Η μεθοδολογία βασίζεται στην απομόνωση των πρωτεϊνών από το τυρόγαλό με την διαδικασία της αντιστρέψιμης χημικής δέσμευσης με χρήση ειδικών ρητινών. Η πλήρης διαδικασία αναφέρεται στο ακόλουθο σχήμα (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Μέθοδος παραγωγής WPI με ανταλλαγή ιόντων

ii. Μικροφιλτράρισμα

Βασίζεται όπως και στην περίπτωση των WPC στο φιλτράρισμα του τυρογάλακτος μέσω μεμβράνης όπου η διαλυτή πρωτεΐνη μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά σε διάλυση (λακτόζη, ανόργανα στοιχεία) αποβάλλονται (MF permeate). Κατόπιν ακολουθεί δεύτερο στάδιο φιλτραρίσματος με μεμβράνες (υπερδιήθηση – UF) όπου διαχωρίζονται και συμπυκνώνονται οι πρωτεΐνες από τα υπόλοιπα συστατικά όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Μέθοδος παραγωγής WPI με μικροφιλτράρισμα

Οι ion Exchange WPI υπερτερούν τεχνολογικά των MFWPI όσο αφορά την συγκράτηση νερού , δημιουργία πηχτής και ενσωμάτωση αέρα ενώ υπολείπονται διατροφικά καθώς έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και υψηλότερη σε νάτριο

1.7.2 Αντιοξειδωτική δράση-πλεονεκτήματα

Οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος (Bayford 2010), οι οποίες αποτελούν ένα σύμπλεγμα σφαιρικών πρωτεϊνών που παραμένουν σε υγρή φάση κατά την διάρκεια παρασκευής του τυριού και είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και μεθειονίνη καθώς και σε υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA), συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής τους σε ένα από τα κυριότερα ενδογενή μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως είναι η γλουταθειόνη (Marshall 2004) και έτσι επιταχύνουν την ανάκτηση και την προσαρμογή του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες (Kerasioti et al., 2012). Επίσης, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλοντας στην δομική και λειτουργική ακεραιότητα των κυττάρων του, έχουν αντιμικροβιακές και θεραπευτικές ιδιότητες (Caccano 2002). Επιπροσθέτως η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βοηθάει στην πέψη με συνέπεια την αντιμετώπιση γαστρεντερικών ασθενειών όπως συχνά επεισόδια διάρροιας

(Dhanappriya et al., 2014), εμποδίζει αναπτυξιακές ανωμαλίες κατά την εμβρυική περίοδο, την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και τα συχνά επεισόδια αποβολών (Agarwal et al., 2006; Aurousseau et al., 2006), βοηθάει στην αύξηση της δύναμης, καθώς και στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών (Kerasioti et al. 2013), βελτιώνει την πρόσληψη τροφής, την ημερήσια αύξηση, την μετατροπή της τροφής σε σωματικό βάρος, τις επιδόσεις και γενικότερα την ευζωία των αγροτικών ζώων (Urbaityte et al. 2009). Διαθέτουν όπως αναφέρθηκε αντιοξειδωτική δράση παρεμποδίζοντας την υπερβολική συσσώρευση των ελεύθερων ριζών. Έτσι, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική η συμβολή των αντιοξειδωτικών ουσιών στην ευζωία των ζωικών οργανισμών σε όλα τα στάδια του κύκλου της ζωής τους και είναι ιδιαίτερης σημασίας η δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών και η εισαγωγή τους στην καθημερινή διατροφή ειδικότερα στα πρωταρχικά στάδια μετά την γέννηση όπου η φυσική άμυνα του οργανισμού δεν επαρκεί για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος θα χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία βιολειτουργικών ζωοτροφών με σκοπό την προστασία των ζώων από το οξειδωτικό στρες αλλά και τη γενικότερη βελτίωση της ευζωίας τους και την αύξηση της παραγωγικότητάς τους.

1.8 Γενικές Πληροφορίες Για Τα Γουρούνια

Ο χοίρος (κοινώς γουρούνι) είναι οικόσιτο θηλαστικό ζώο και ανήκει στο υποείδος *sus scrofa domesticus*. Πιστεύεται ότι προέρχεται από τον αγριόχοιρο, μέσω εξημέρωσης από την παλαιολιθική εποχή. Είναι ζώο παμφάγο και πολύ γόνιμο. Απαντάται σε όλα τα μέρη της γης και εκτρέφεται κυρίως για το κρέας του. Ο χοίρος προσαρμόζεται σε όλες τις συνθήκες, ωστόσο αναπτύσσεται καλύτερα σε ψυχρά κλίματα. Είναι αδηφάγο ζώο και τρώει από όλες τις τροφές. Το πεπτικό του σύστημα μπορεί να επεξεργαστεί κάθε είδους τροφή. 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. Μερικές από τις σημαντικότερες ράτσες του χοίρου είναι η British Yorkshire, η British Berkshire, η νορμανδική και η ιβηρική ή μεσογειακή (εδώ ανήκει ο ελληνικός οικόσιτος χοίρος).



Εικόνα 18: Γουρουνία.

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση γουρουνιών.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	
Kingdom	Metazoa
Phylum	Chordata
Subphylum	Craniata
Class	Mammalia
Order	Artiodactyla
Infraorder	Suina
Family	Suidae
Subfamily	Suinae
Tribe	Suini
Genus	<i>Sus</i>
Species	<i>Sus scrofa</i>
Subspecies	<i>Sus scrofa domesticus</i>

1.8.1 Εγκυμοσύνη Των Χοίρων

Ο αναπαραγωγικός κύκλος ενός θηλυκού χοίρου διαρκεί 21 ημέρες, ενώ η εγκυμοσύνη περίπου 3 μήνες, 3 εβδομάδες και 3 ημέρες (δηλαδή 114 ημέρες). Οι χοιρομητέρες γεννούν δύο φορές το χρόνο, έχοντας κατά μέσο όρο 11 γουρουνάκια ανά γέννα (Κωνσταντίνος Ν. Σαράντης, 2010). Τα νεογνά αμέσως μετά τη γέννα ζυγίζουν κατά μέσο όρο 0,5-1kg, ενώ στους 2 μήνες που διαρκεί και η πειραματική διαδικασία φτάνουν τα 15 κιλά περίπου.

1.8.2 Ασθένειες Που Προσβάλλουν Τους Χοίρους

Τα νεαρά χοιρίδια πριν από τον απογαλακτισμό τους μαστίζονται από αρκετές ασθένειες, οι οποίες θέτουν σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία τους και οι κυριότερες παρατίθενται στη συνέχεια.

- Coccidiosis: πρόκειται για μια παρασιτική ασθένεια του εντερικού σωλήνα που οφείλεται σε coccidian protozoa (π.χ. *Toxoplasma Gondii*)
- Colibacillosis: πρόκειται για μια ασθένεια που οφείλεται σε μόλυνση του εντερικού σωλήνα ή του ουροποιητικού συστήματος από το βακτήριο *Escherichia coli*
- Υποσιτισμός: λόγω λήψης ανεπαρκούς ποσότητας τροφής
- Διάφορες μολύνσεις από μια ποικιλία μικροοργανισμών.
- Εξιδρωματική επιδερμίτιδα: προκαλείται από το βακτήριο *Staphylococcus hyicus*, το οποίο προσβάλλει το δέρμα προκαλώντας μόλυνση

Άλλες ασθένειες παρατηρούνται μετά τον απογαλακτισμό τους και είναι οι εξής: ασθένειες του αναπνευστικού, δυσεντερία, ψώρα, εντερική συστροφή, έλκος, ερυσίπελας (δερματική νόσος) και παρασιτώσεις.

1.8.3 Εκτροφή Χοίρων

Η παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων (όπως και των 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 κρέας. Η παραγωγή καλής ποιότητας και χαμηλού κόστους κρέατος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ορθολογική και ισορροπημένη 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. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να τηρείται αυστηρώς το ωράριο εκτροφής τους, δηλαδή η παροχή και απομάκρυνση τροφής να πραγματοποιείται σε προκαθορισμένα χρονικά πλαίσια σε καθημερινή βάση. 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 και των προβάτων 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 με τους χοίρους παρακολούθηθηκε η ανάπτυξή τους και συγκεκριμένα καταγράφηκε η ημερήσια αύξηση βάρους καθώς και η ημερήσια κατανάλωση τροφής.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, ασχοληθήκαμε με την αξιοποίηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος που εμπεριέχεται στο τυρόγαλα και το οποίο είναι υποπροϊόν της παραγωγής τυριού. Όταν το τυρόγαλα εναποτίθεται στο περιβάλλον θεωρείται οργανικός ρύπος και προκαλεί διάφορα οικολογικά προβλήματα. Υπάρχει, όμως, και η δυνατότητα, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος, να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων, πλούσιων σε διάφορα θρεπτικά συστατικά, γεγονός το οποίο μειώνει και την περιβαλλοντική επιβάρυνση. Επίσης, οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος εμφανίζουν εκτός των άλλων βιολογικών τους ιδιοτήτων και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, με βάση το παραπάνω σκεπτικό, δημιουργήσαμε συγκεκριμένες ζωτροφές, εμπλουτισμένες με πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey protein) και τις χορηγήσαμε ως διατροφή σε νεαρά χοιρίδια. Σκοπός του πειράματος ήταν η εκτίμηση της επίδρασης αυτών των ζωτροφών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε συγκεκριμένους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας) .

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

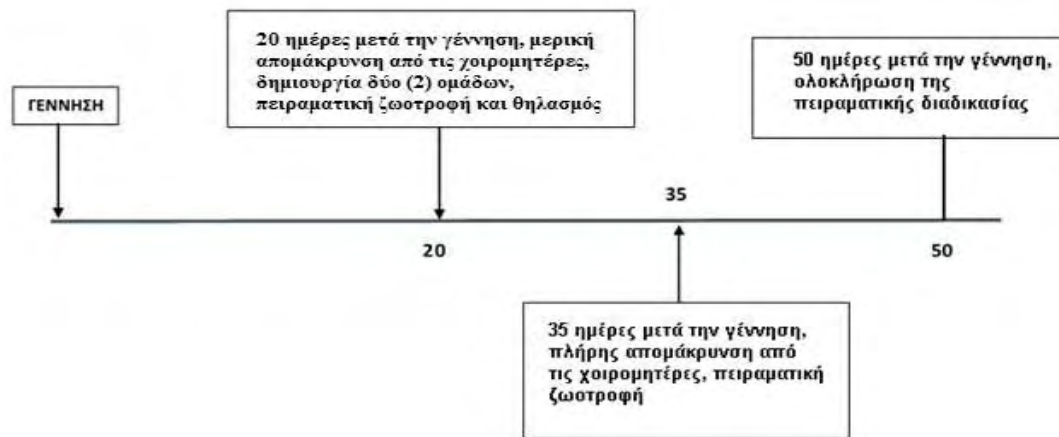
Η εκτροφή των χοιριδίων πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις εκτροφής χοίρων, του ΤΕΙ Θεσσαλίας στη Λάρισα και συγκεκριμένα στους θαλάμους του κτιρίου ξηράς περιόδου-τοκετού οξείας απογαλακτισμού. Τόσο οι συνθήκες διαβίωσης τους όσο και ο τρόπος θανάτωσής τους για τη λήψη αίματος και ιστών 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 19: Οι χώροι εγκατάστασης στις οποίες εκτρέφθηκαν τα χοιρίδια.

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). Λόγω της μεγάλης ζήτησης του άπαχου κρέατος, εκτρέφονται κυρίως οι παραπάνω φυλές οι οποίες και παρουσιάζουν περισσότερο κρέας και λιγότερο λίπος.

Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική διαδικασία .



Εικόνα 20: Πειραματική διαδικασία εκτροφής - απογαλακτισμού των χοιριδίων.

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 συνήθες πειραματικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΜΣΖ) ανάπτυξης χοιριδίων. Στην ομάδα Β χορηγήθηκε ΜΣΖ ανάπτυξης, στο οποίο ενσωματώθηκε πρωτεΐνη τυρογάλακτος.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας του πειραματισμού, τα χοιρίδια απομακρύνονταν καθημερινά, από τις χοιρομητέρες τους σε διαφορετικά κελιά για χρονικό διάστημα οκτώ (8) ωρών, ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα του πειραματισμού η καθημερινή απομάκρυνση από τις χοιρομητέρες αυξήθηκε σε δέκα (10) ώρες. Η απομάκρυνση των χοιρομητέρων, δηλαδή ο απογαλακτισμός των νεαρών χοιριδίων, έγινε 35 μέρες μετά την γέννηση τους, οπότε και τα νεαρά χοιρίδια μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστό κελί (ανά ομάδα) και καταναλώνανε όλη τη μέρα μόνο το πειραματικό σιτηρέσιο που τους χορηγήθηκε. Συγχρόνως, όλες αυτές τις μέρες γινόταν συνεχής παρακολούθηση της ημερήσιας κατανάλωσης στα σιτηρέσια απογαλακτισμού.





Εικόνα 21: Η εκτροφή των χοιριδίων στα κελιά τους.

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, συμπίεζοντας 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 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 Ενσίρωματος

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 (άλευρο), 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 ενσίρωμένο 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 ανάμειξη των συστατικών το ενσίρωμα τοποθετήθηκε σε σακούλες κενού αέρος και παρακολουθήθηκε 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 2: Τα πειραματικά σιτηρέσια της ομάδας control και της ομάδας whey.

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

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

3.3 Ιστοληψία

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 (**50 μέρες**) (**10 ζώα**).

Υλικά:

Οι ιστοί των ζωτικών οργάνων (νεφρός, στόμαχος, πάγκρεας, πνεύμονας) αφαιρέθηκαν χειρουργικά με τη βοήθεια νυστεριού, μεταφέρθηκαν σε ειδικές κασέτες, σε υγρό άζωτο και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους.



Εικόνα 22: Διατήρηση και αποθήκευση των ιστών σε κασέτες.

3.3.2 Ομογενοποίηση ιστών

Η ομογενοποίηση των ιστών εκτελέστηκε με δύο μεθόδους.

A) Με γουδί και γουδοχέρι: Αρχικά, πήραμε ένα μικρό μέρος του παγωμένου ιστού από το ψυγείο των -80°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°C). Η φύλαξή όλων των ομογενοποιημένων ιστών πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 23: Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ομογενοποίηση.

Β) 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°C), πήραμε το υπερκείμενο και το προσθέσαμε σε νέα Eppendorf. Τέλος, αφότου ομογενοποιήθηκαν όλοι οι ιστοί, διατηρήθηκαν στους -80oC μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση.



Εικόνα 24: Ο ομογενοποιητής.

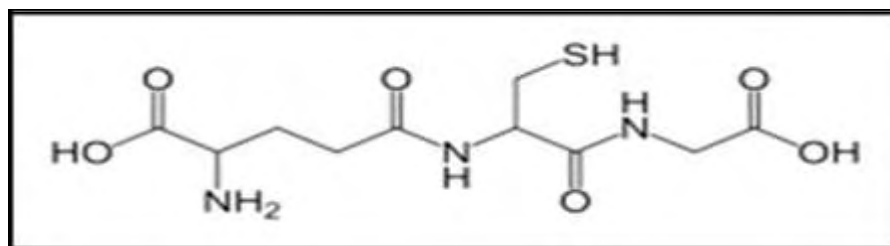
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

3.4.1 Γενικά

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

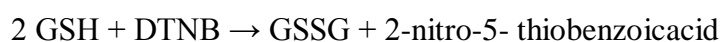


Εικόνα 25: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

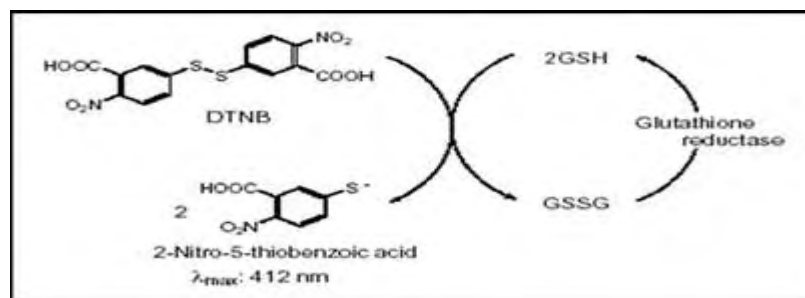
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και ηθειολτρανσφεράση (Battinetal, 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και 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, A., *et al.*, 2004).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται σε αιμόλυμα ή σε ομογενοποιημένο ιστό. 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., Y.N., 2004).



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



Εικόνα 26: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7,95). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,95.
- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39,6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396,35
- **Κιτρικό Νάτριο**. (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, 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

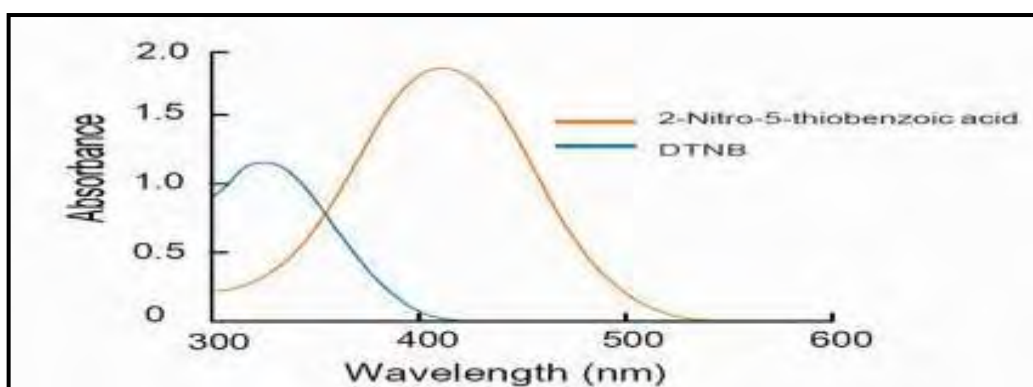
Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf. 20 μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660 μL

ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια eppendorf:

Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH.

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	20 μL

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 κυβελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (Roland., F., *et al.*, 1952).



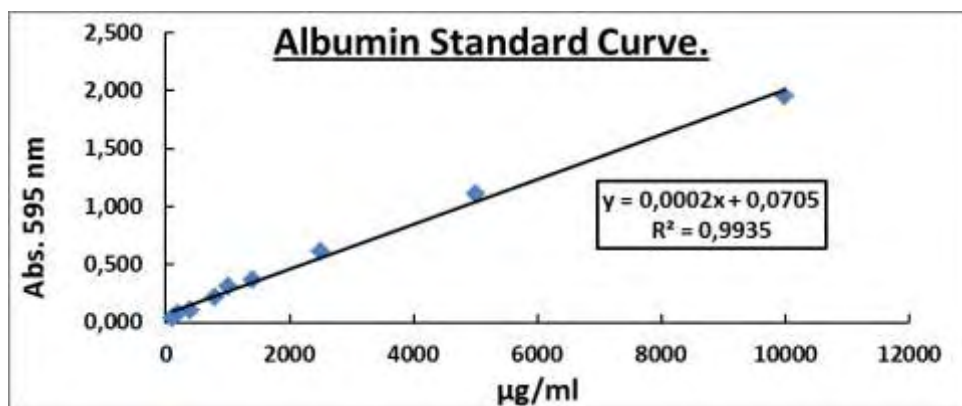
Εικόνα 27: Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

A) Υπολογισμοί για ιστούς

Δραστικότητα GSH (μmol/mg total prot.) = (Absδείγματος - Δabstυφλού/13.6) × 2 × 3 (λόγω αραιώσεων) × 50.5 / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/mL).

Όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) (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 $x = \text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)}$. Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.



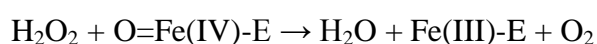
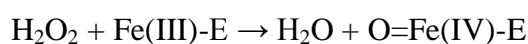
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

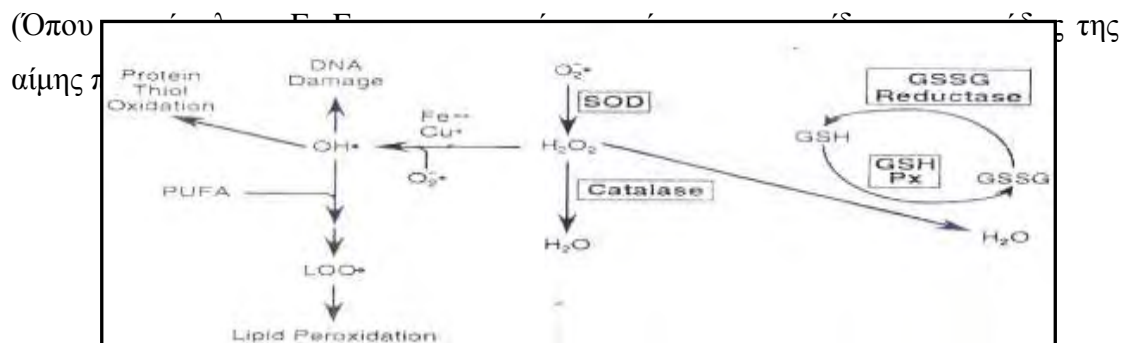
3.4.3 Δραστικότητα της Καταλάσης

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 υπεροξειδίου 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 P, et. al., (2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. (Boon EM, et. al. 2007). Στο τετρεμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:





Εικόνα 28: Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε H_2O .

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi *et al.*, (1984).

Διαλύματα

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2955 μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	40 μL

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

A) Υπολογισμοί για ιστούς

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = ($\Delta Abs_{\text{sample}}$ 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 H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για τον μυϊκό και εγκεφαλικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. ΔAbs = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H₂O₂ στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

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

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

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[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Διαλύματα

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.
- **DPPH 0.1 mM.** MB: 394.32

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

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

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

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

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 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του

χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

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 μL στην κυψελίδα / 40 μL 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.

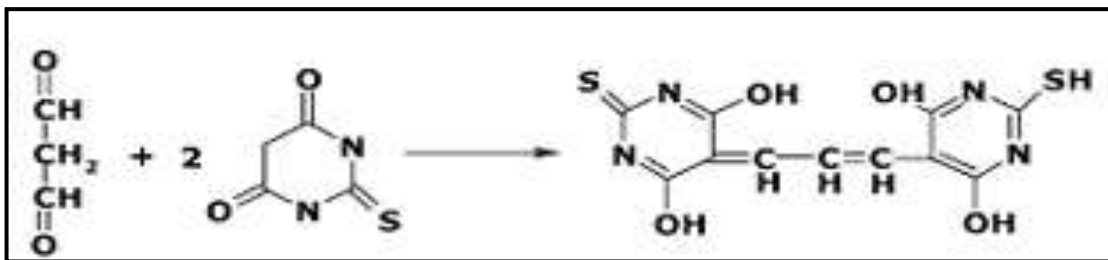
Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:
 $\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot.}$

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 μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της

μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 29: 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 200 mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

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

- **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na₂SO₄): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού για τα δείγματα και απεσταγμένο νερό για το τυφλό. Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 $^\circ\text{C}$ για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL 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 (3100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (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 αραίωση 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.

3.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

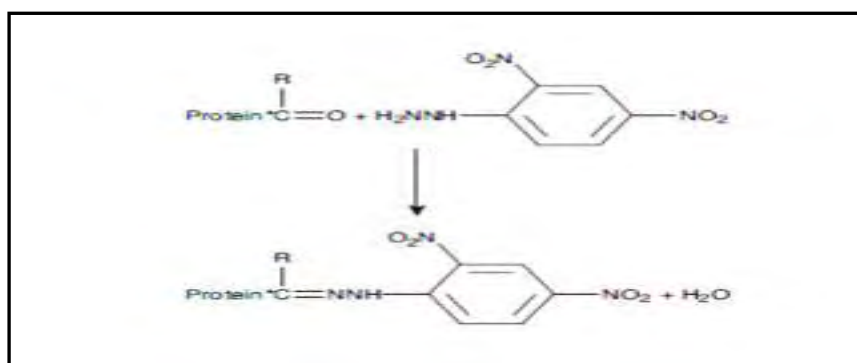
Αρχή της μεθόδου

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 (αλδεύδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $\text{C} = \text{O}$, 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 οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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

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



Εικόνα 30: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δινιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

Διαλύματα

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

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

- **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1)

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

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς

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

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N 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 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

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

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

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

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

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 22 mM x cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL 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).

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).

3.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, ως μέση τιμή ± SEM ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου IBM SPSS 22. Συγκεκριμένα, εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (One-Way ANOVA), με

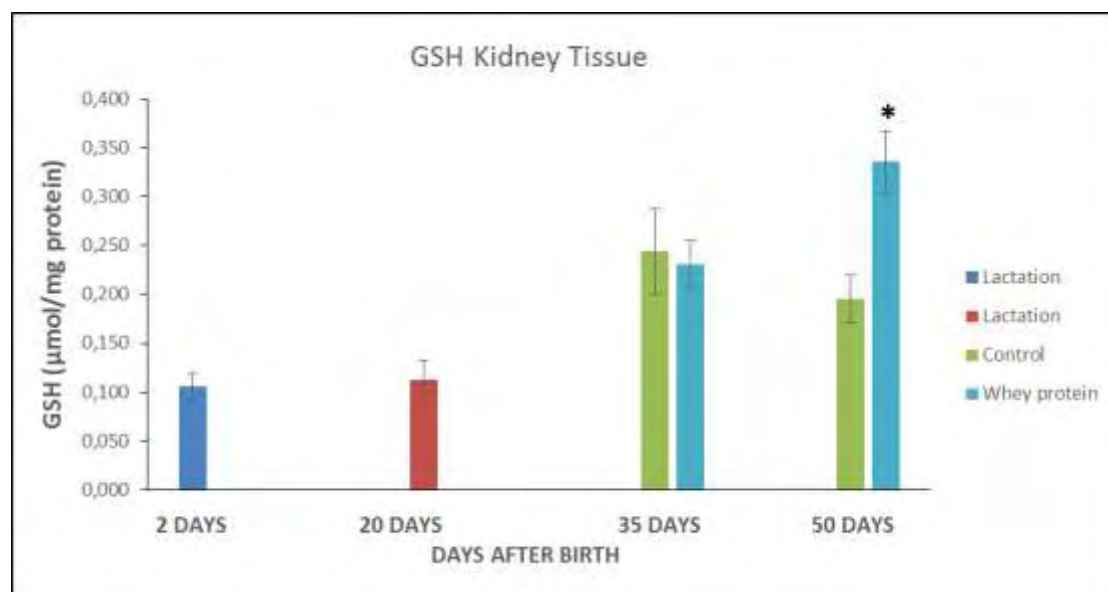
την επιλογή των παραμέτρων post-hoc, Tukey προσδιορίζοντας το επίπεδο σημαντικότητας σε $*p < 0.05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα μετρήσεων δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας) στους χοίρους

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες για τους ιστούς 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.

4.1.1 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον νεφρό



Διάγραμμα 11: Τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στον νεφρό 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

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

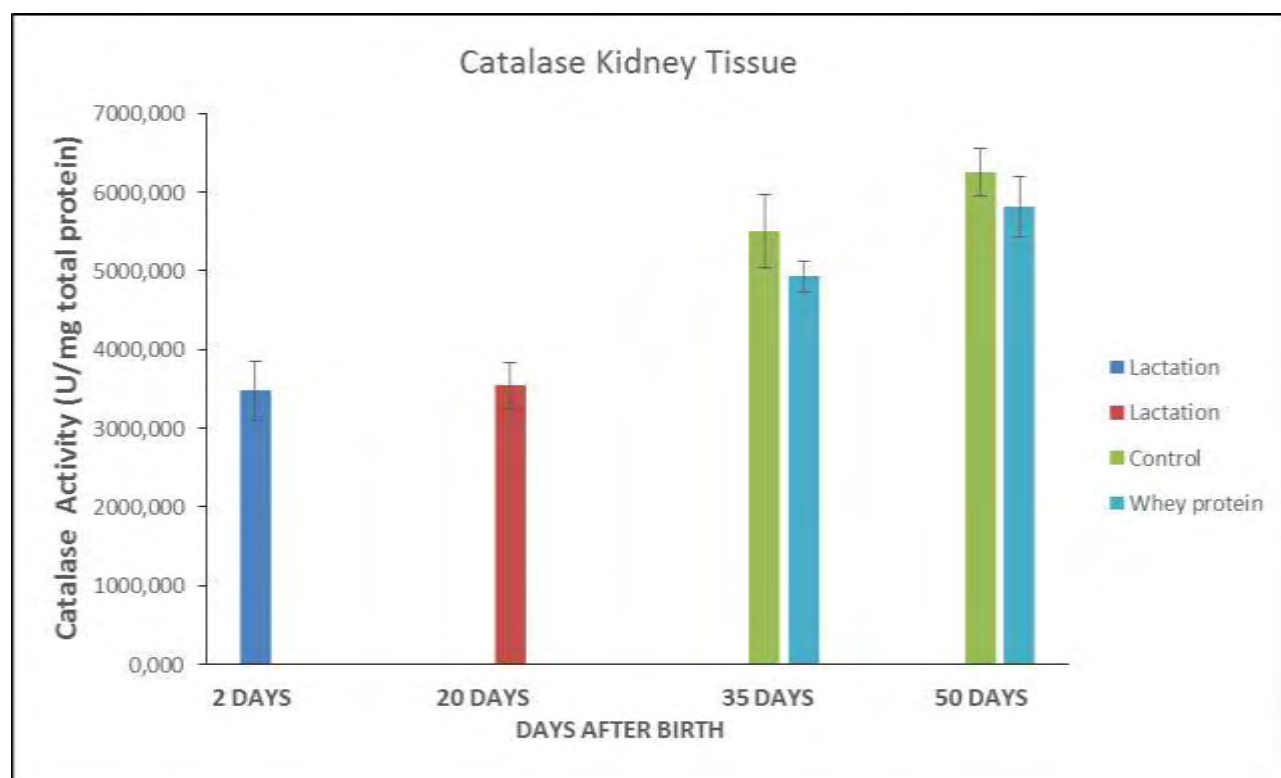
Στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της GSH.

Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (71,79%) ($p < 0,05$) στα επίπεδα της GSH στα ζώα της ομάδας whey σε σχέση με τα ζώα της ομάδας control.

Πίνακας 8: Επίπεδα γλουταθειόνης στον νεφρό στις ομάδες control και στις ομάδες whey.

GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,244 \pm 0,0439	0,195 \pm 0,0242
Whey	0,231 \pm 0,0241	0,335 \pm 0,0319 $p < 0,05$

4.1.2 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον νεφρό



Διάγραμμα 12: Τα επίπεδα της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) στον νεφρό διαφορετικών ομάδων ηλικίας χοίρων κρεατοπαραγωγής.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων της καταλάσης στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

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

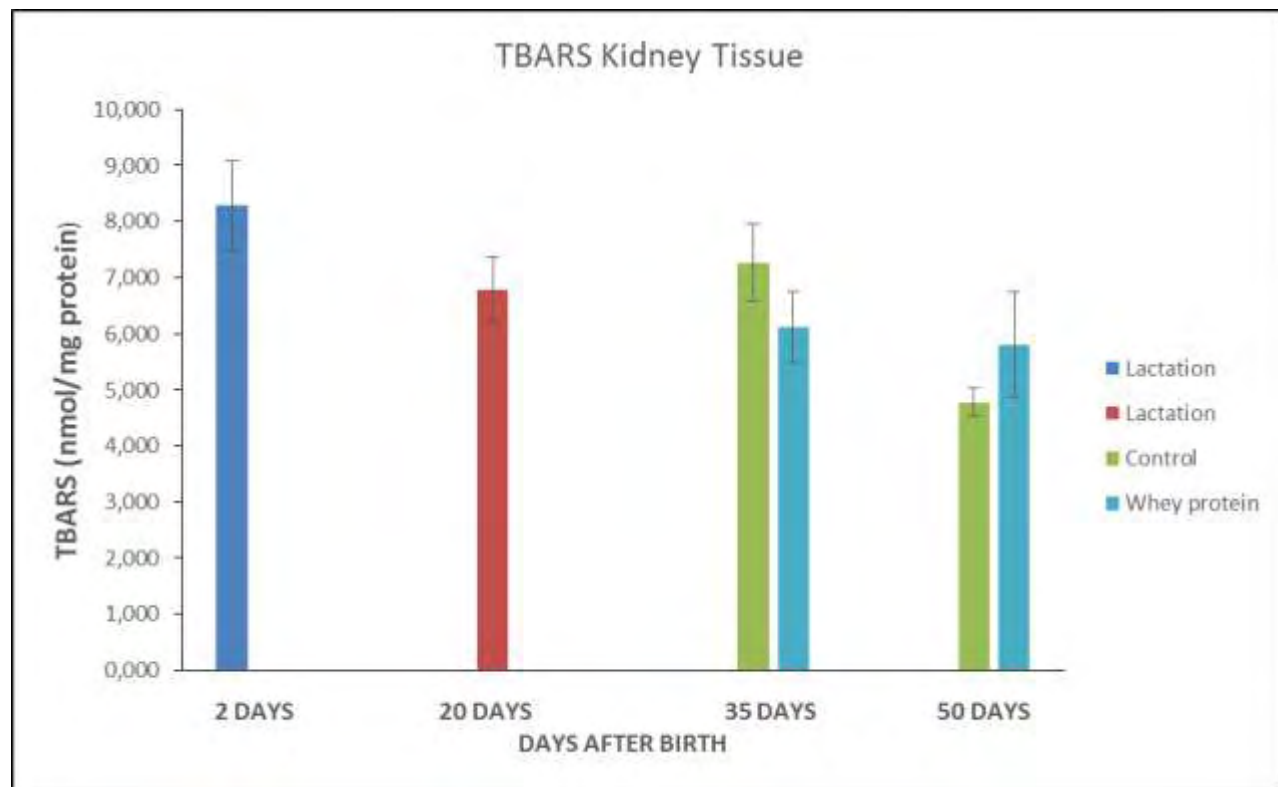
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της καταλάσης (CAT) τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 9: Επίπεδα καταλάσης στον νεφρό στις ομάδες control και στις ομάδες whey.

CAT (U/mg Protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	5505,651 ± 462,7259	6252,446 ± 306,5796
Whey	4926,237 ± 189,9278	5816,239 ± 378,0238

4.1.3 Επίπεδα των TBARS στον νεφρό



Διάγραμμα 13: Επίπεδα των TBARS στον νεφρό.

- Σύγκριση των ομάδων control

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

- Σύγκριση των ομάδων whey

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

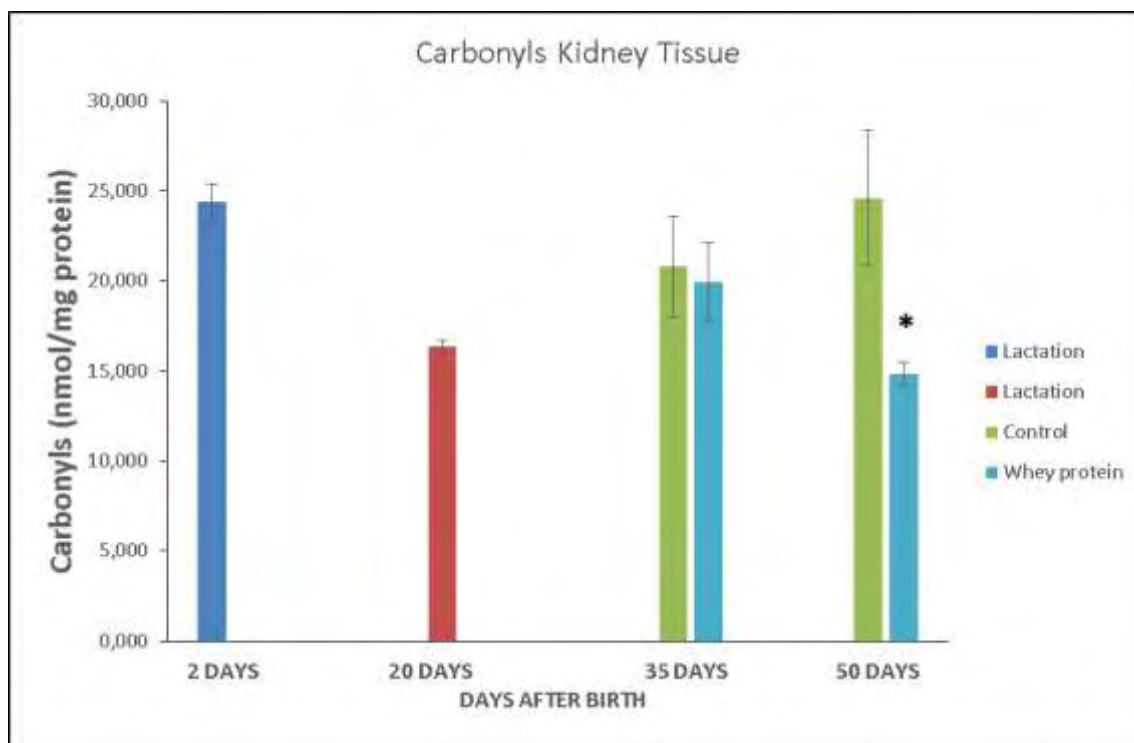
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες.

Πίνακας 10: Επίπεδα TBARS στον νεφρό στις ομάδες control και στις ομάδες whey.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	7,268 \pm 0,6874	4,776 \pm 0,2534
Whey	6,118 \pm 0,6280	5,804 \pm 0,9365

4.1.4 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρό



Διάγραμμα 14: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση (**p<0,05**) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

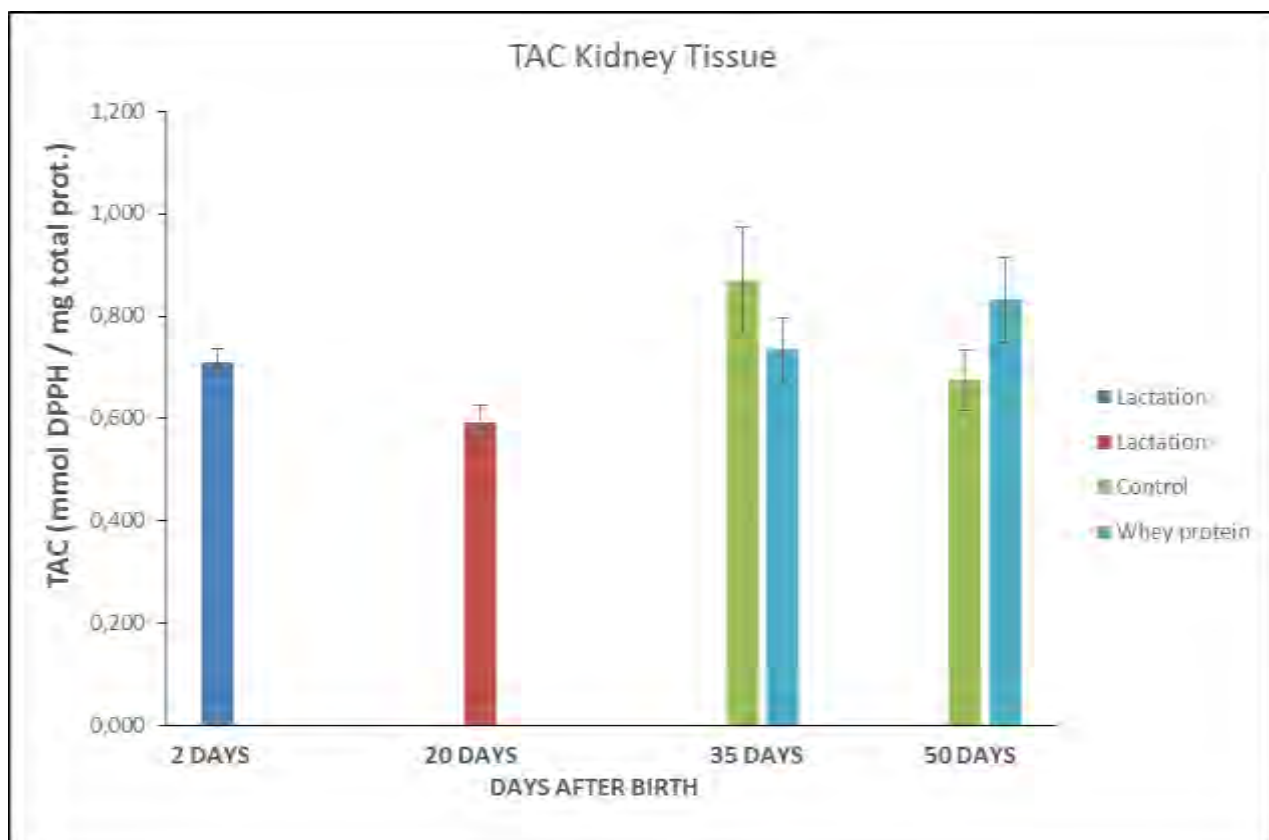
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (**39,84%**) (**p<0,05**) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα της ομάδας whey σε σχέση με τα ζώα της ομάδας control.

Πίνακας 11: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον νεφρό στις ομάδες control και στις ομάδες whey.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	20,807 ± 2,8058	24,593 ± 3,7664
Whey	19,945 ± 1,2105	14,794 ± 1,0120

4.1.5 Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον νεφρό



Διάγραμμα 15: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον νεφρό.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

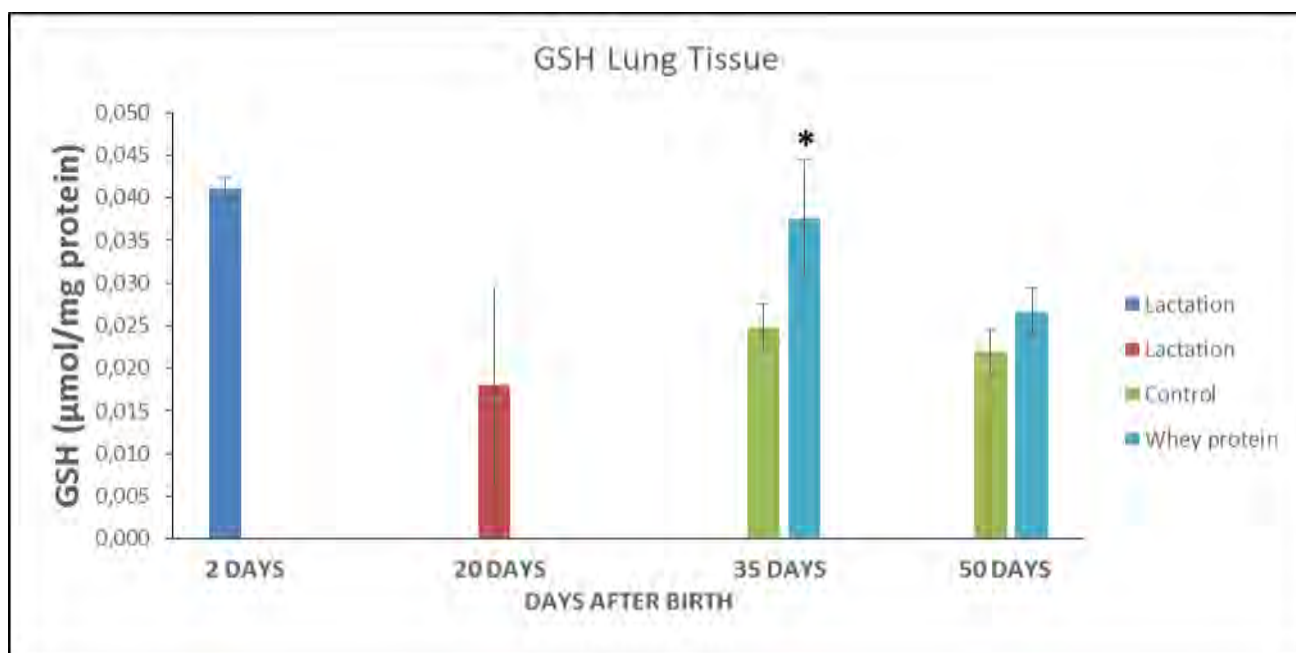
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 12: Επίπεδα της TAC στον νεφρό στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,871 ± 0,1034	0,674 ± 0,0592
Whey	0,734 ± 0,0633	0,832 ± 0,0830

4.1.6 Επίπεδα Γλουταθειόνης (GSH) στον πνεύμονα



Διάγραμμα 16: Επίπεδα της γλουταθειόνης στον πνεύμονα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

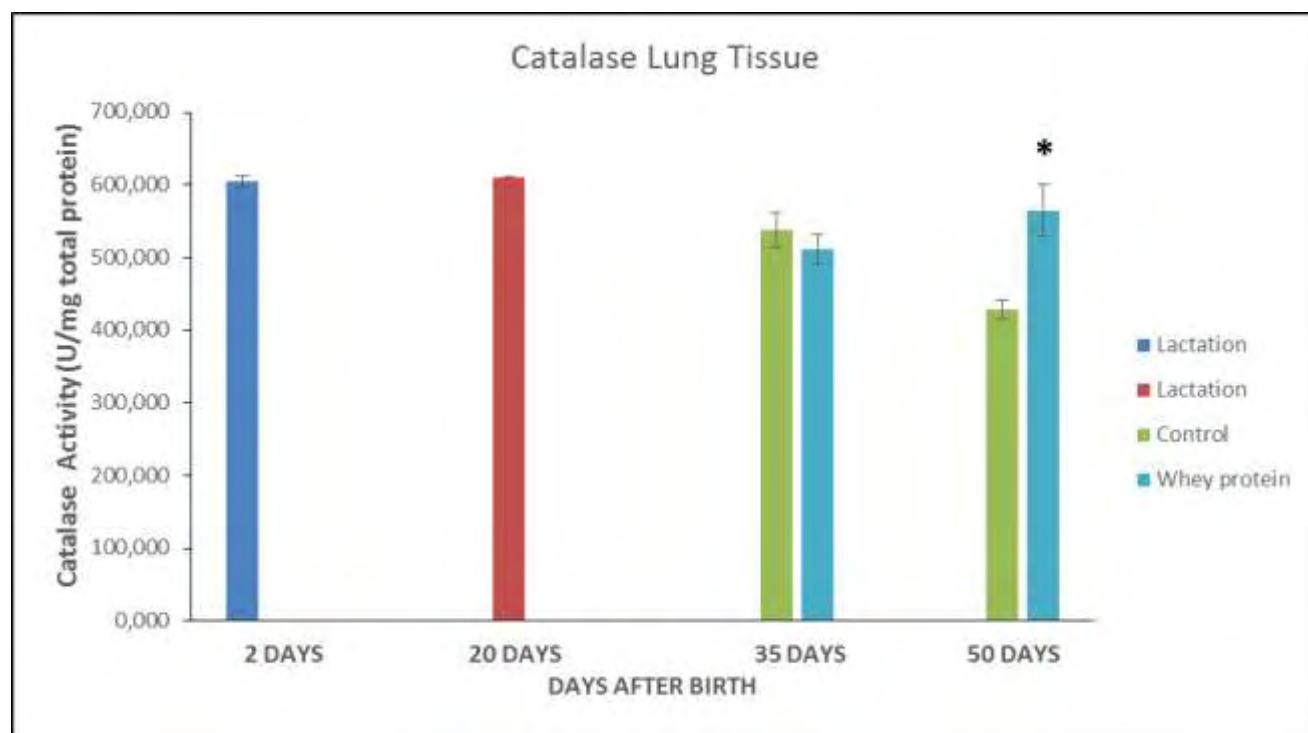
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (52%) ($p < 0,05$) των επιπέδων της GSH στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά

Πίνακας 13: Επίπεδα της GSH στον πνεύμονα στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,025 \pm 0,0028	0,022 \pm 0,026
Whey	0,038 \pm 0,0069	0,027 \pm 0,0027
	$p < 0,05$	

4.1.7 Επίπεδα Καταλάσης (CAT) στον πνεύμονα



Διάγραμμα 17: Επίπεδα της καταλάσης στον πνεύμονα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της CAT στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών.

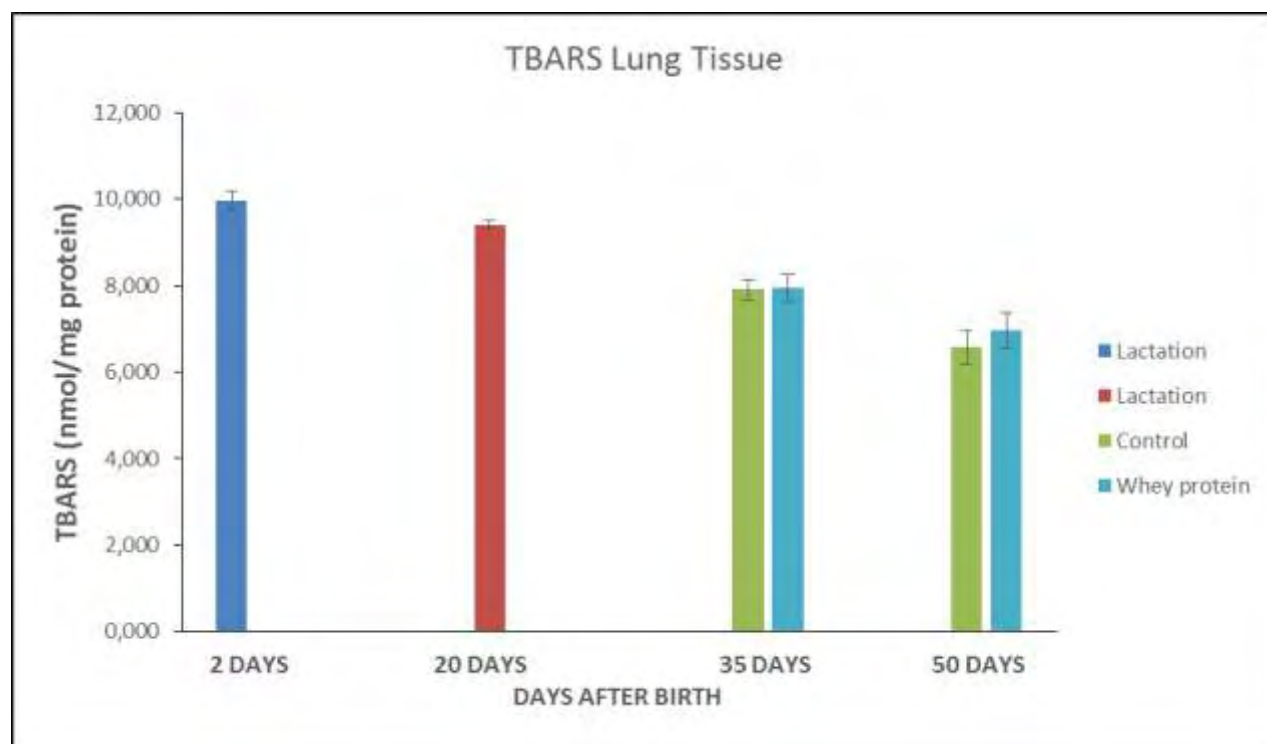
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (**39,76%**) ($p < 0,05$) των επιπέδων της καταλάσης στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

Πίνακας 14: Επίπεδα της CAT στον πνεύμονα στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	537,790 ± 23,5519	428,290 ± 13,7315
Whey	511,616 ± 20,9882	598,619 ± 34,9483
		$p < 0,05$

4.1.8 Επίπεδα των TBARS στον πνεύμονα



Διάγραμμα 18: Επίπεδα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (TBARS) στον πνεύμονα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

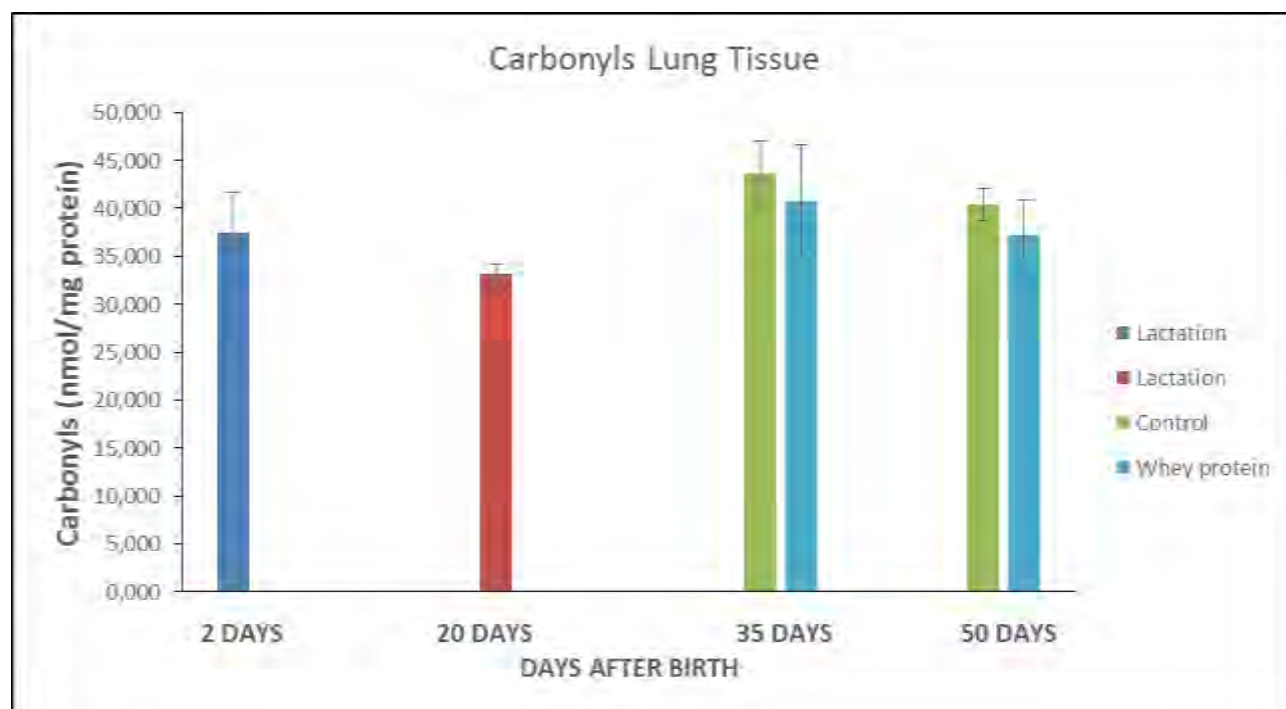
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 15: Επίπεδα των TBARS στον πνεύμονα στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	7,902 ± 0,2419	6,561 ± 0,3825
Whey	7,941 ± 0,3126	6,950 ± 0,4193

4.1.9 Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνεύμονα



Διάγραμμα 19: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνεύμονα.

- Σύγκριση των ομάδων control

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

- Σύγκριση των ομάδων whey

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

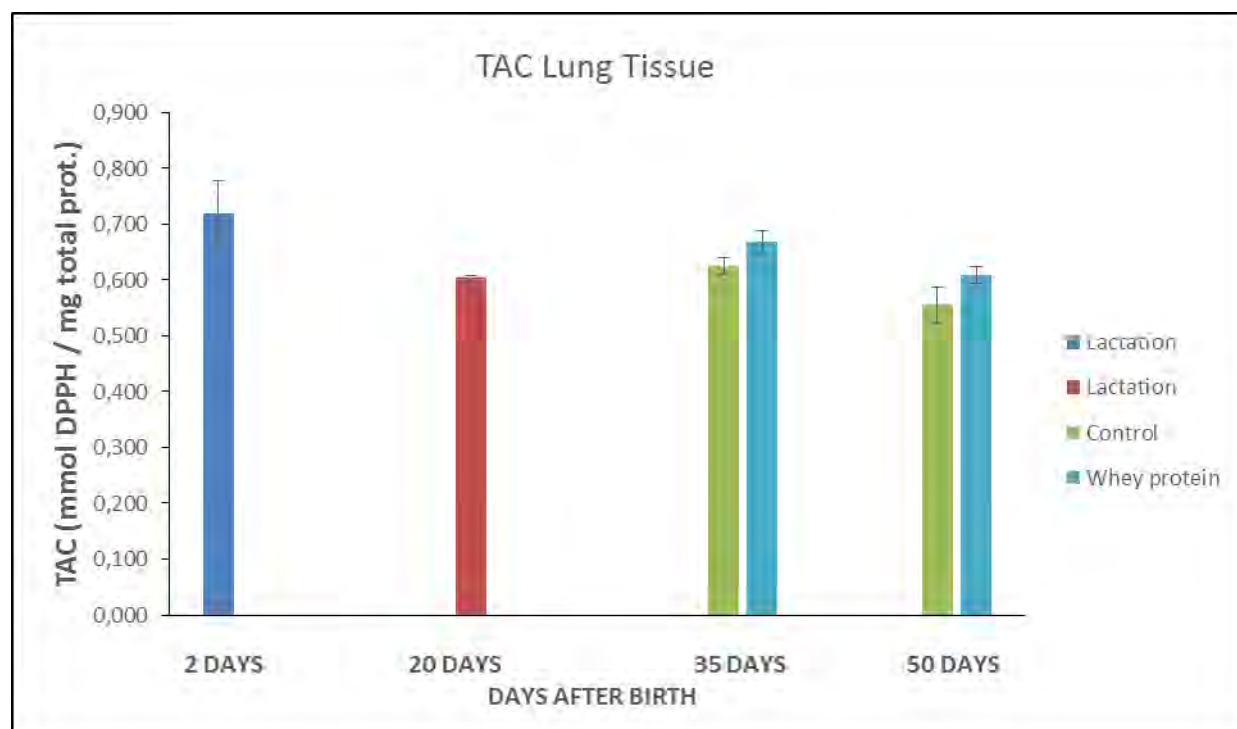
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 16: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον πνεύμονα στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	43,568 ± 3,4140	40,356 ± 1,6516
Whey	40,864 ± 5,7223	37,175 ± 3,6975

4.1.10 Επίπεδα της TAC στον πνεύμονα



Διάγραμμα 20: Επίπεδα της TAC στον πνεύμονα.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

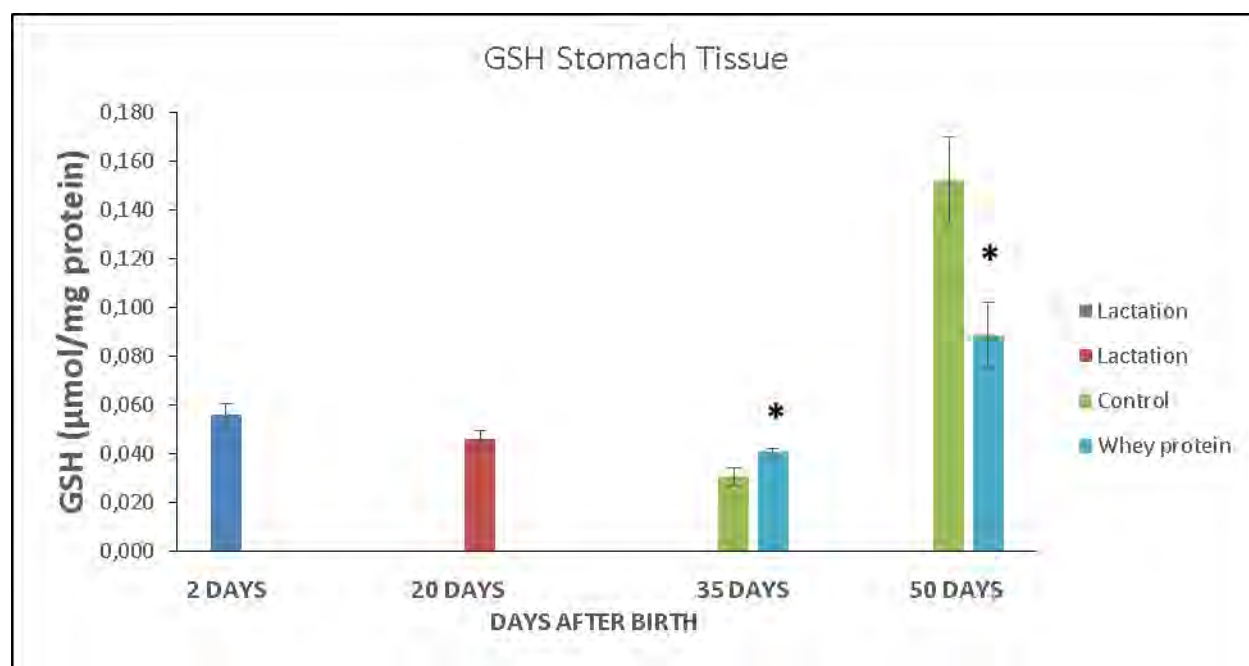
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 17: Επίπεδα της TAC στον πνεύμονα στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,625 ± 0,0152	0,555 ± 0,0314
Whey	0,668 ± 0,0216	0,609 ± 0,0142

4.1.11 Επίπεδα Γλουταθειόνης στον στόμαχο



Διάγραμμα 21: Επίπεδα της GSH στον στόμαχο.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

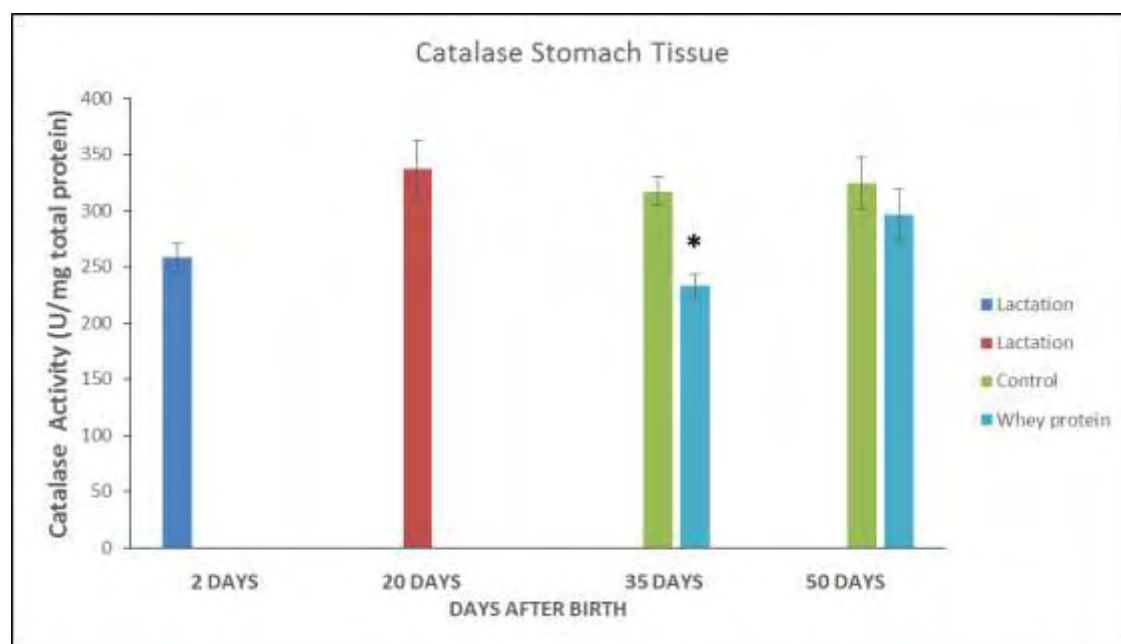
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση (**32,25%**) ($p < 0,05$) στα επίπεδα της GSH ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (**41,83%**) ($p < 0,05$) των επιπέδων της GSH στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

Πίνακας 18: Επίπεδα της GSH στον στόμαχο στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) M.O. \pm SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,031 \pm 0,008	0,153 \pm 0,018
Whey	0,041 \pm 0,0016 $p < 0,05$	0,089 \pm 0,0135 $p < 0,05$

4.1.12 Επίπεδα Καταλάσης στον στόμαχο



Διάγραμμα 22: Επίπεδα της CAT στο στομάχι.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

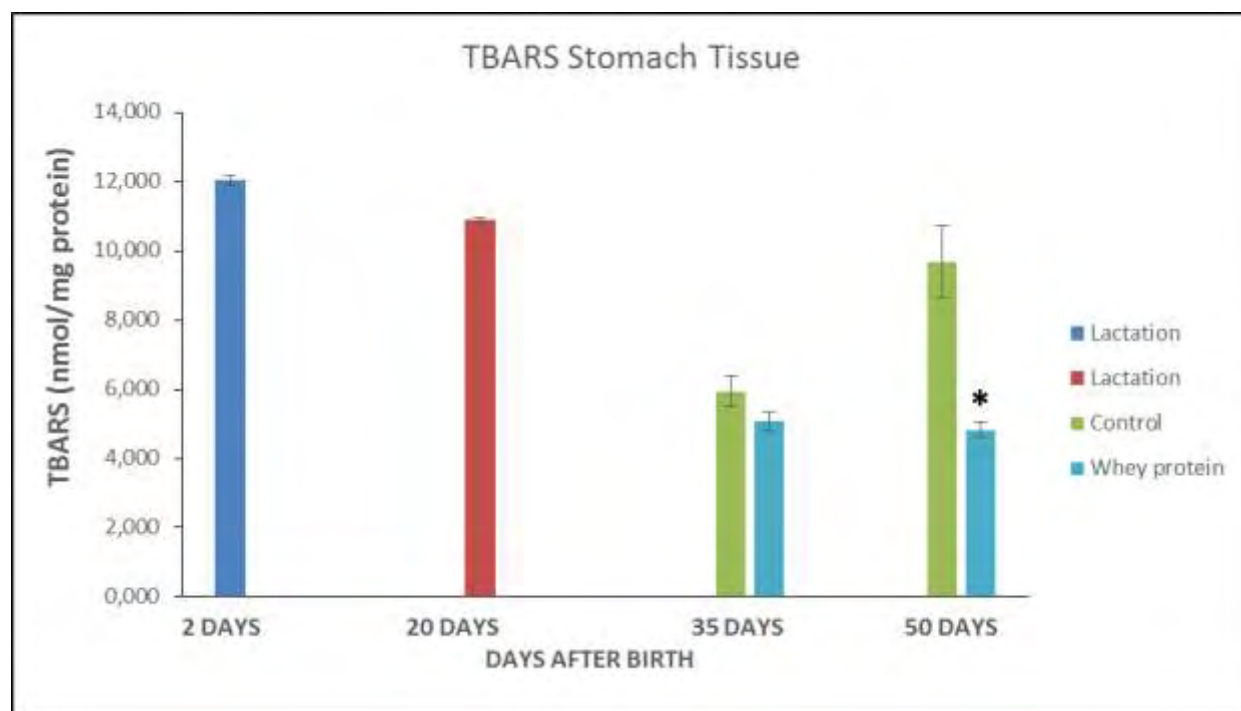
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (**26,54%**) ($p < 0,05$) των επιπέδων της καταλάσης στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control. Στις 50 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά

Πίνακας 19: Επίπεδα της CAT στον στόμαχο στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CAT (U/mg Protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	317,011 ± 12,5337	324,421 ± 23,0883
Whey	232,872 ± 11,0088	296,286 ± 23,0146
	$p < 0,05$	

4.1.13 Επίπεδα των TBARS στον στόμαχο



Διάγραμμα 23: Επίπεδα των TBARS στο στομάχι.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

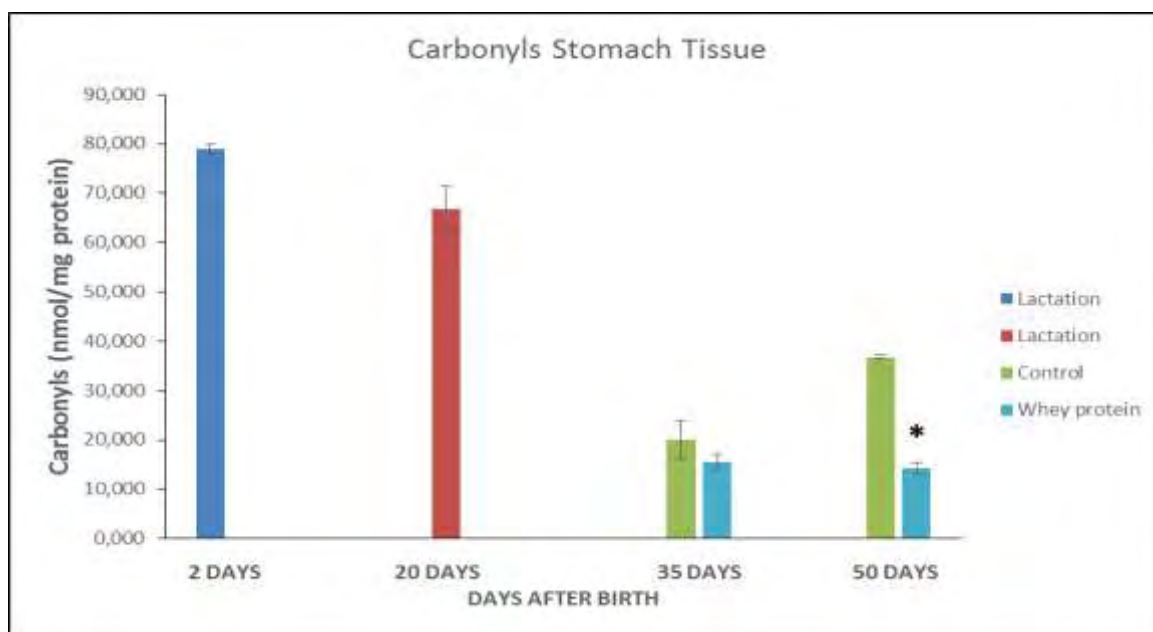
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (**50,14%**) ($p < 0,05$) στα επίπεδα των TBARS στα ζώα της ομάδας whey σε σχέση με τα ζώα της ομάδας control

Πίνακας 20: Επίπεδα των TBARS στον στόμαχο στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	5,947 ± 0,4340	9,679 ± 1,0436
Whey	5,080 ± 0,2925	4,825 ± 0,2276
		p < 0,05

4.1.14 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στόμαχο



Διάγραμμα 24: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στόμαχο.

- Σύγκριση των ομάδων control

Προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

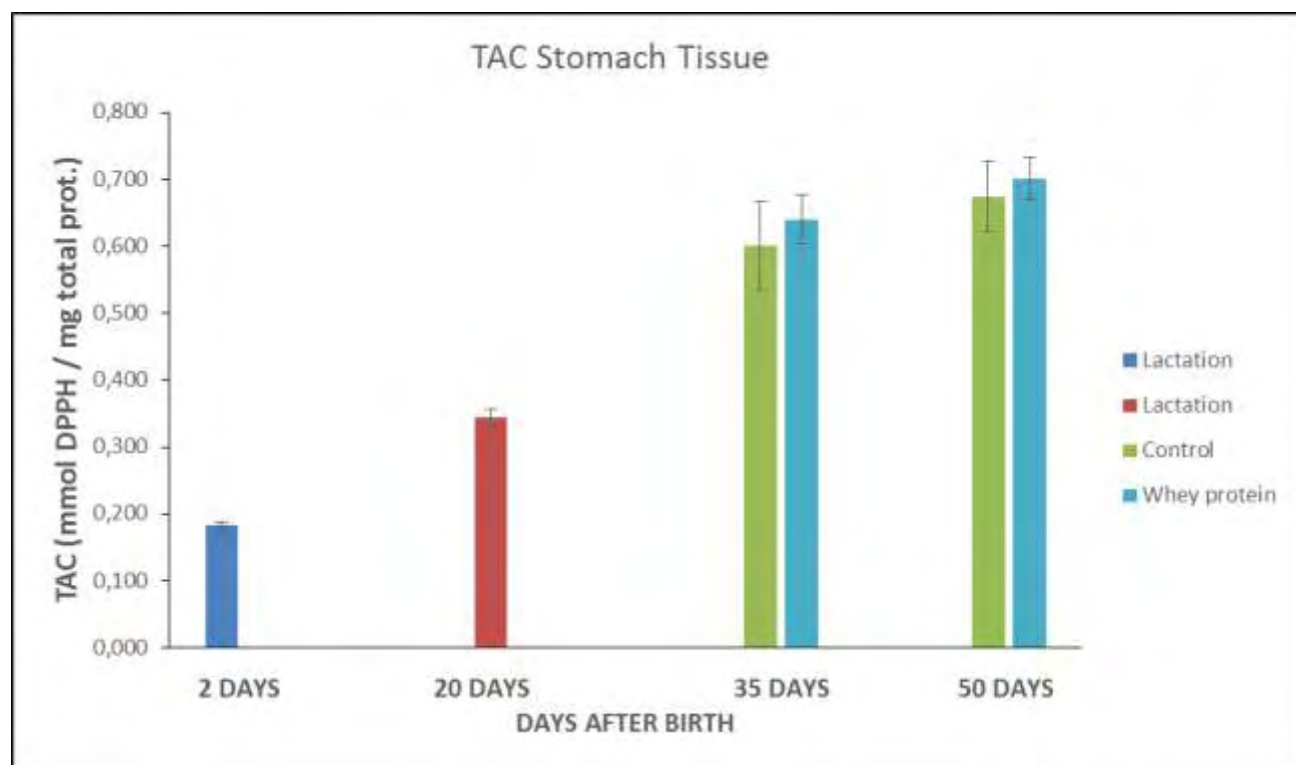
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση (**61,21%**) ($p < 0,05$) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

Πίνακας 21: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον στόμαχο στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	20,113 ± 3,7454	36,731 ± 0,4475
Whey	15,493 ± 1,6684	14,274 ± 1,2494
		$p < 0,05$

4.1.15 Επίπεδα της TAC στον στόμαχο



Διαγραμμα 25: Επίπεδα της TAC στον στόμαχο.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

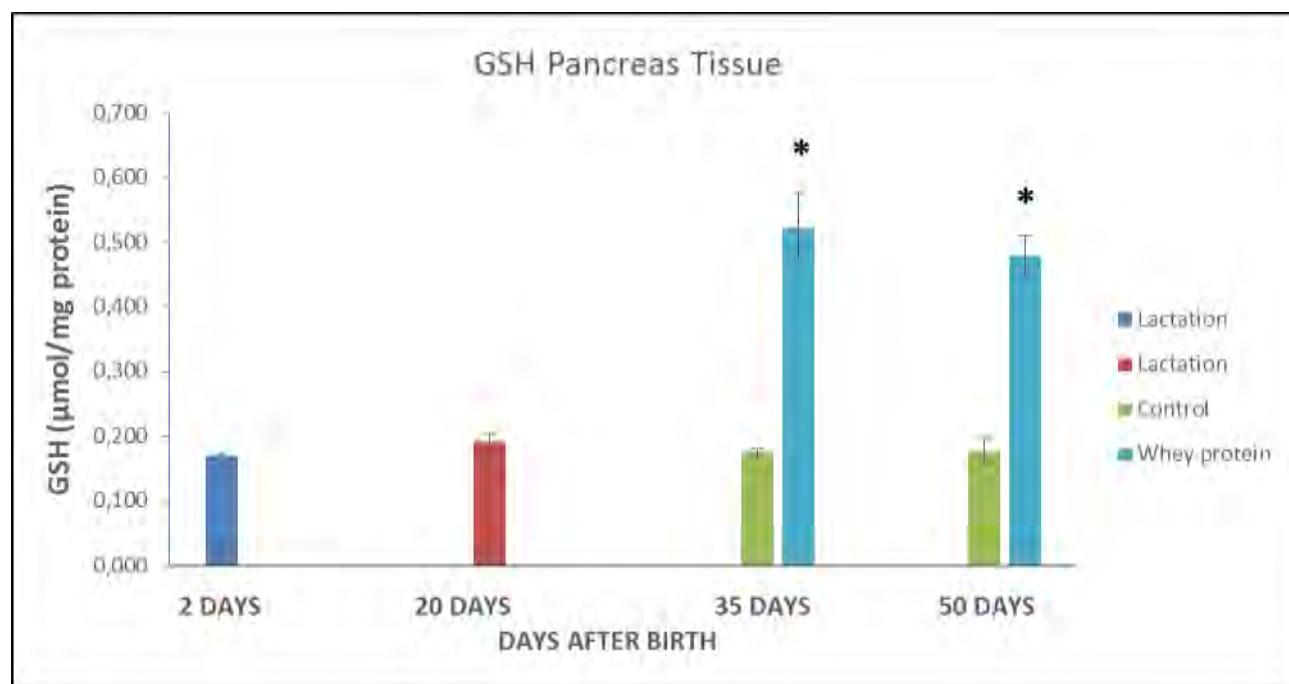
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες

Πίνακας 24: Επίπεδα της TAC στον στόμαχο στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,601 ± 0,0672	0,674 ± 0,0530
Whey	0,640 ± 0,0360	0,700 ± 0,0321

4.1.16 Επίπεδα Γλουταθειόνης στο πάγκρεας



Διάγραμμα 26: Επίπεδα της GSH στο πάγκρεας.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων της γλουταθειόνης στα ζώα ηλικίας 35 και 50 ημερών

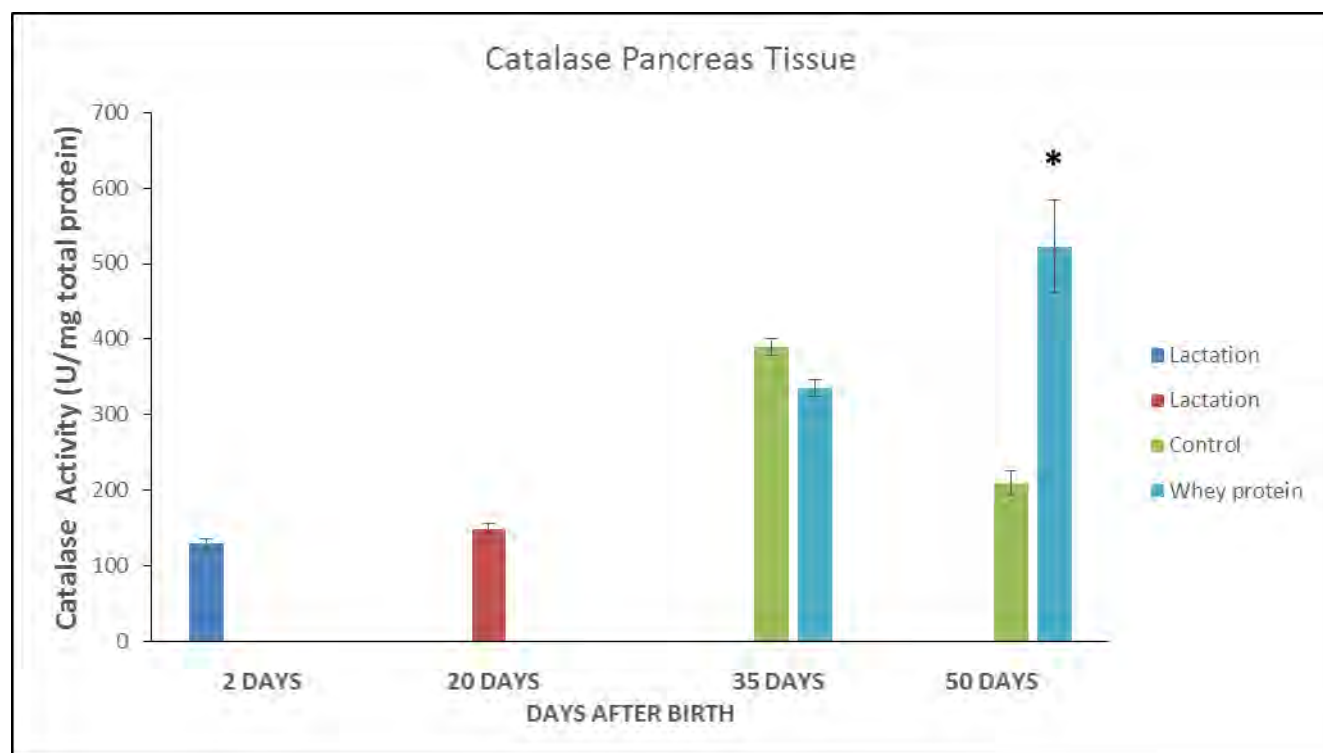
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση (**197,71%**) ($p < 0,05$) στα επίπεδα της GSH στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control. Επίσης στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (**169,10%**) ($p < 0,05$) των επιπέδων της GSH

Πίνακας 25: Επίπεδα της GSH στο πάγκρεας στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

GSH (μmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,175 ± 0,0054	0,178 ± 0,0189
Whey	0,521 ± 0,0554 $p < 0,05$	0,479 ± 0,0306 $p < 0,05$

4.1.17 Επίπεδα Καταλάσης στο πάγκρεας



Διάγραμμα 27: Επίπεδα της CAT στο πάγκρεας.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών.

- Σύγκριση των ομάδων whey

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της CAT ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

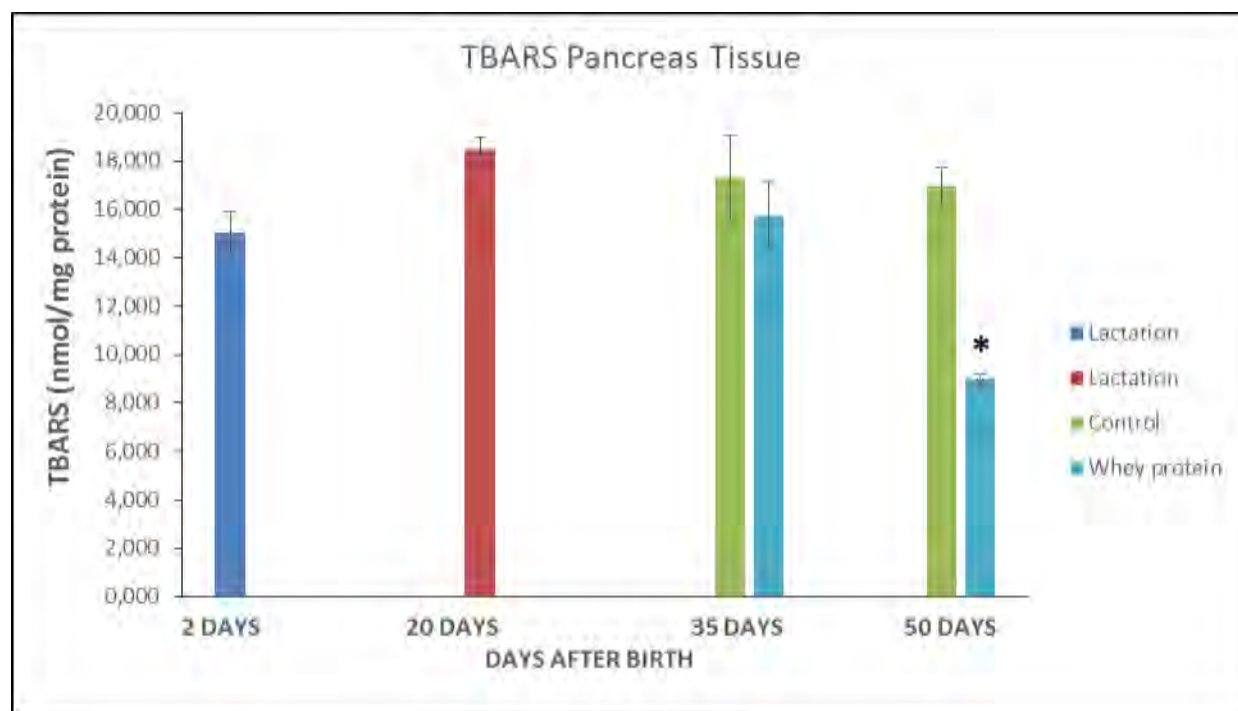
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της καταλάσης ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (149,10%) ($p < 0,05$) των επιπέδων της καταλάσης στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

Πίνακας 26: Επίπεδα της CAT στο πάγκρεας στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CAT (U/mg Protein)M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	389,918 ± 10,5973	209,799 ± 16,2168
Whey	334,790 ± 10,6899	522,615 ± 61,2628
		$p < 0,05$

4.1.18 Επίπεδα των TBARS στο πάγκρεας



Διάγραμμα 23: Επίπεδα των TBARS στο πάγκρεας.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα των TBARS ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

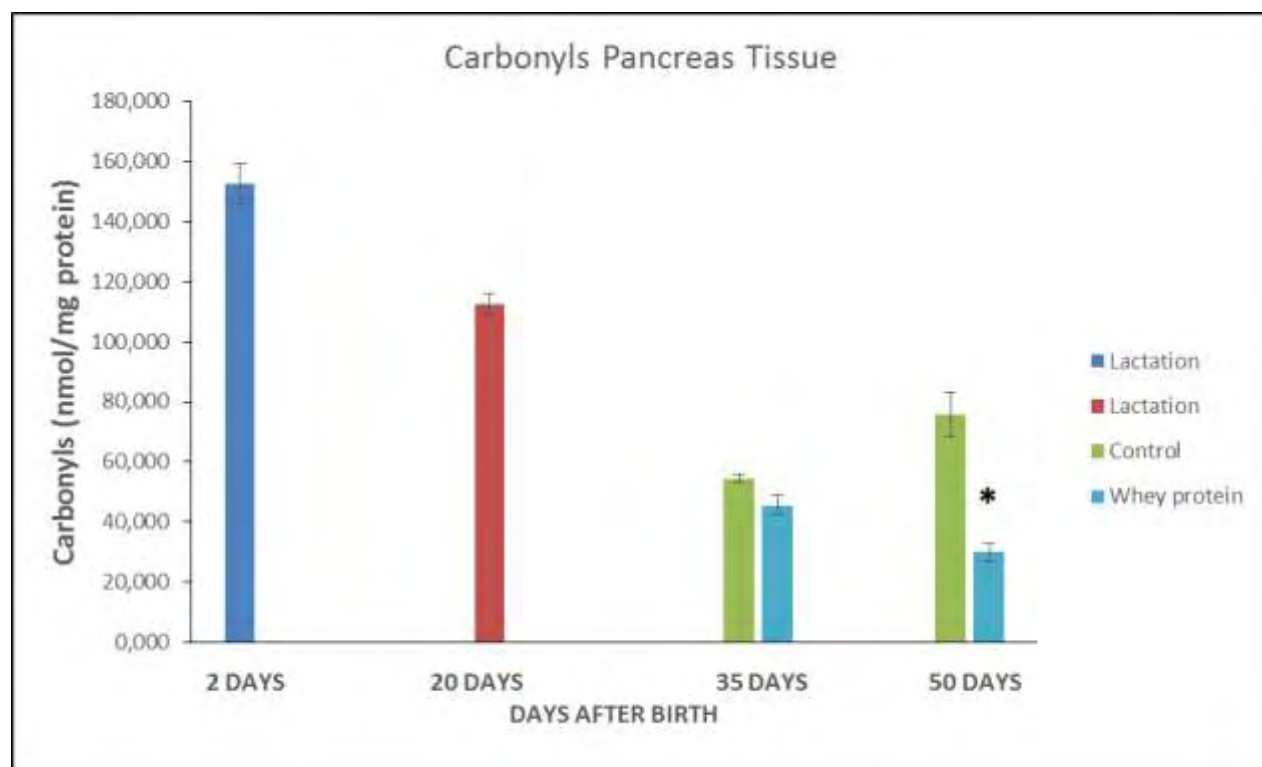
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS ενώ στις 50 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (**46,99%**) (**p<0,05**) στα επίπεδα των TBARS στα ζώα της ομάδας whey σε σχέση με τα ζώα της ομάδας control

Πίνακας 20: Επίπεδα των TBARS στο πάγκρεας στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TBARS (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	17,314 ± 1,7147	16,930 ± 0,7657
Whey	16,728 ± 1,3742	8,974 ± 0,2258
		p<0,05

4.1.19 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πάγκρεας



Διάγραμμα 24: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πάγκρεας.

- Σύγκριση των ομάδων control

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση ($p < 0,05$) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

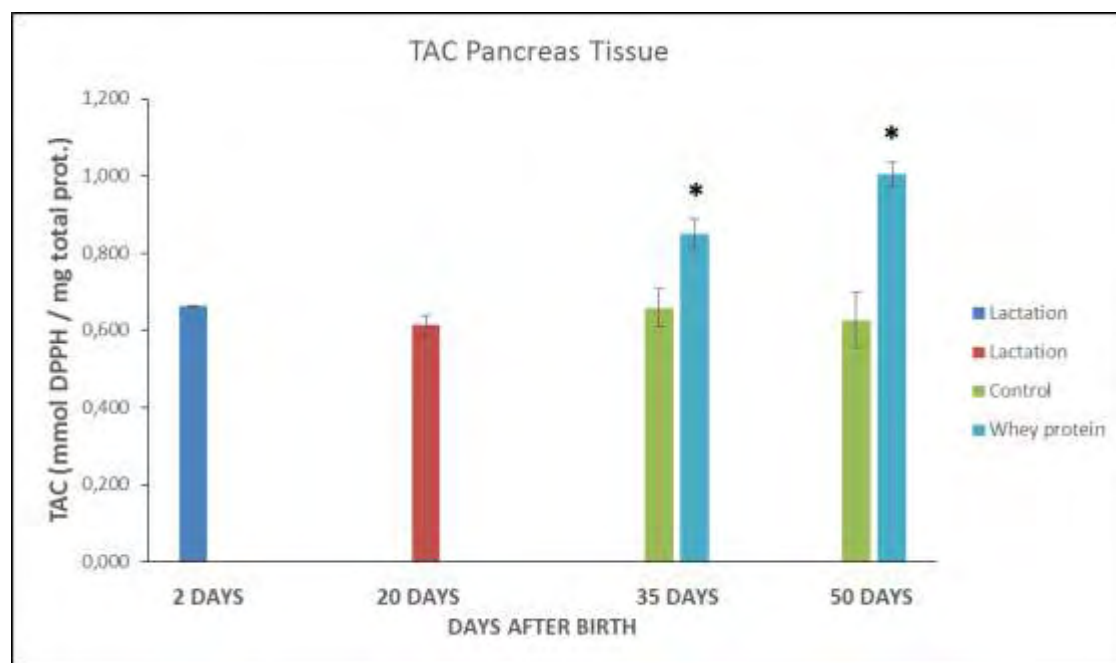
- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες whey

Στις 35 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ενώ στις 50 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση (**60,31%**) ($p < 0,05$) στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control.

Πίνακας 21: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πάγκρεας στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

CARB (nmol/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	54,579 ± 1,2973	75,679 ± 7,4177
Whey	46,609 ± 3,4793	30,034 ± 2,9898
		p<0,05

4.1.20 Επίπεδα της TAC στο πάγκρεας



Διαγραμμα 25: Επίπεδα της TAC στο πάγκρεας.

- Σύγκριση των ομάδων control

Δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων whey

Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p<0,05$) στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στα ζώα 35 και 50 ημερών

- Σύγκριση των ομάδων control με τις ομάδες

Στις 35 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση (**29,33%**) (**p<0,05**) στα επίπεδα της TAC στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control. Στις 50 ημέρες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση (**60,38%**) (**p<0,05**) στα επίπεδα της TAC στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control

Πίνακας 24: Επίπεδα της TAC στο πάγκρεας στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες whey.

TAC (mmol DPPH/mg protein) M.O. ± SEM	35 ημέρες	50 ημέρες
Control	0,658 ± 0,0487	0,626 ± 0,0716
Whey	0,851 ± 0,0391	1,004 ± 0,0327
	p<0,05	p<0,05

4.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας) των χοίρων

Πίνακας 25: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στον νεφρό.

(NS=non significant, + = αύξηση, - = μείωση) (p<0,05)

	ΝΕΦΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Whey protein	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS
	50 DAYS: +71,79%	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS	50 DAYS: -39,84%	50 DAYS: NS

Πίνακας 26: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών οξειδωτικού στρες στο πνεύμονα.

(NS=non significant, + = αύξηση, - = μείωση) (p<0,05)

	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Whey protein	35 DAYS: +52%	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS
	50 DAYS: NS	50 DAYS: +39,76%	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS	50 DAYS: NS

Πίνακας 27: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών στον στόμαχο.

(NS=non significant, + = αύξηση, - = μείωση) (p<0,05)

	ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Whey protein	35 DAYS: +32,25%	35 DAYS: -26,54%	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS
	50 DAYS: -41,83%	50 DAYS: NS	50 DAYS: -50,14%	50 DAYS: -61,21%	50 DAYS: NS

Πίνακας 28: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεικτών στο πάγκρεας.

(NS=non significant, + = αύξηση, - = μείωση) (p<0,05)

	ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ				
	GSH	CATALASE	TBARS	CARBONYLS	TAC
Control					
Whey protein	35 DAYS: +197,71%	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: NS	35 DAYS: +29,33%
	50 DAYS: +169,10%	50 DAYS: +149,10%	50 DAYS: -46,99%	50 DAYS: -60,31%	50 DAYS: +60,38%

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 πενητηκοστή (50) μέρα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των δεικτών οξειδωτικού στρες στον νεφρό, στο πνεύμονα, στο στομάχι καθώς και στο πάγκρεας 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 στον νεφρό, στο πνεύμονα, στον στόμαχο καθώς και στο πάγκρεας, όργανα τα οποία είναι ζωτικής σημασίας.

Οι δείκτες που αναφέρθηκαν και παραπάνω μελετήθηκαν, διότι αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η **γλουταθειόνη** είναι το κυριότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό που παράγεται από τα κύτταρα, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των

ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου, ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα μέσω της διατροφής αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους (Scholz *et al.*, 1964) (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 (GST) στο κυτταροπλασματικό υγρό, στα μικροσώματα και στα μιτοχόνδρια. Είναι επίσης ικανή να συμμετέχει σε μη ενζυματικές συζευκτικές αντιδράσεις με κάποιες ουσίες. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανηγμένης γλουταθειόνης, τα επίπεδά της βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα στον νεφρό κατά (71,79% στις 50 ημέρες), στον πνεύμονα (52% στις 35 ημέρες) και στο πάγκρεας (197,71% και 169,10% στις 35 και 50 ημέρες) στα χοιρίδια της ομάδας whey σε σχέση με τα χοιρίδια της ομάδας control. Από την άλλη, στον στομαχικό ιστό, τα επίπεδα της GSH βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα (32,25% στις 35 ημέρες) και στατιστικώς σημαντικά μειωμένα (41,83% στις 50 ημέρες) στα χοιρίδια της ομάδας whey σε σχέση με τα χοιρίδια της ομάδας control. Επομένως, φαίνεται ότι η συγκέντρωση της GSH αυξάνεται στατιστικά σημαντικά σε συνάρτηση με το χρόνο από τη στιγμή που χορηγήθηκε στα ζώα το σιτηρέσιο που ήταν εμπλουτισμένο με πρωτεΐνη τυρογάλακτος, κάτι που υποδηλώνει ότι ίσως οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος επιδρούν στη διαφοροποίηση των κύριων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της GSH. Αυτά τα ένζυμα είναι η λιγάση της γ-γλουταμινοκυστεΐνης (GCL) και η 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 παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της GSH αφού έχει αποδειχθεί ότι η κυστεΐνη μετατρέπεται ενδοκυτταρικά σε GSH, ενισχύοντας κατά αυτό τον τρόπο την αντιοξειδωτική άμυνα (Marshall 2004). Ειδικά στο πάγκρεας παρατηρείται μεγάλη

αύξηση της GSH καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι στο πάγκρεας η GSH αλλά και ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της παρουσιάζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αυξάνει ακόμα περισσότερο την συγκέντρωση της GSH και των ενζύμων (Githens 1991). Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της GSH επάγοντας την έκφραση ή την ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων σε χοίρους με χαμηλή GSH. Αντιθέτως, η whey protein μπορεί να μειώσει την έκφραση ή να αναστείλει την δραστηριότητα του GCL ή GSH συνθετάσης σε χοίρους με υψηλή GSH. Αυτό παρατηρείται στον στόμαχο όπου η GSH μειώνεται στατιστικά σημαντικά (31,66% στις 50 ημέρες) στην ομάδα whey σε σχέση με την ομάδα control. Δηλαδή στις 35 ημέρες τα επίπεδα της GSH στον στόμαχο στα ζώα του μάρτυρα είναι χαμηλά, οπότε σε αυτή την ηλικία είναι απαραίτητη η αύξηση της GSH από την πειραματική ζωοτροφή. Ωστόσο, τα ζώα των 50 ημερών από μόνα τους παράγουν πλέον υψηλά επίπεδα GSH στον στόμαχο και έτσι στην περίπτωση αυτή δεν είναι αναγκαίο να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί αύξησης της GSH από την πειραματική ζωοτροφή. Επίσης, αυτό μπορεί να οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι στον στομαχικό ιστό καταναλώθηκε σημαντική ποσότητα GSH καθώς παρατηρείται ότι στις 50 ημέρες τα επίπεδα των TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώνονται με αποτέλεσμα η ποσότητα της GSH που έχει καταναλωθεί να παρέχει προστασία από την οξειδωση των λιπιδίων και πρωτεϊνών.

Όσον αφορά την αξιολόγηση από τις μετρήσεις για τη δραστηριότητα της **καταλάσης**, από την σύγκριση της ομάδας control με την ομάδα whey, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στον πνεύμονα (39,76% στις 50 ημέρες) και στο πάγκρεας (149,10% στις 50 ημέρες). Αντιθέτως στον στόμαχο παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση (26,54% στις 35 ημέρες). Όσον αφορά στην μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης στον στόμαχο 35 ημερών που παρατηρείται, 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_2O_2 . Η καταλάση δρα απευθείας ενώ η GSH δρα μέσω του ενζύμου GPx (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) στην εξουδετέρωση του H_2O_2 , 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 Grx (Kerasioti *et al.*, 2013) Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στον στόμαχο στις 35 ημέρες, όπου η GSH είναι σε στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα, η καταλάση να βρίσκεται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη και να λειτουργεί κυρίως ο μηχανισμός της GSH. Αντιθέτως, στο πάγκρεας από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η whey protein επιδρά τόσο στον μηχανισμό της GSH όσο και στον μηχανισμό της καταλάσης καθώς στις 50 ημέρες παρατηρείται αύξηση της GSH και της δραστηριότητας της καταλάσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η whey protein εξαιτίας της αντιοξειδωτικής της δράσης ενεργοποιεί της έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Nuclear factor like-2) κάτι που φαίνεται ξεκάθαρα στον παγκρεατικό ιστό και χρήζει περαιτέρω διερεύνηση για να διαλευκανθεί ο ρόλος της whey protein όσον αφορά τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα.

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. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των **TBARS** στους χοίρους της ομάδας whey σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, βλέπουμε ότι είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένα στον στόμαχο (50,14% στις 50 ημέρες). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι στον στόμαχο στις 35 ημέρες τα επίπεδα της **GSH είναι αυξημένα όπου στην συνέχεια στις 50 ημέρες μειώνονται οπότε κάποια ποσότητα GSH έχει θυσιαστεί κάτι που οδηγεί στη μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης** και επομένως στην απόλυτα φυσιολογική μείωση των TBARS. Επίσης στο πάγκρεας παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση (46,99% στις 50 ημέρες) των TBARS, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τόσο τα επίπεδα της GSH όσο και τα επίπεδα της καταλάσης είναι αυξημένα οπότε συνεισφέρουν στην μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας του κρέατος, καθώς και στην παραγωγή διάφορων τοξικών ενώσεων (Rey *et al.*, 2001). Ειδικότερα, η οξείδωση 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 υπεροξείδωσης 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).

Όσον αφορά την ολική **αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)**, αυτή αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Όπως είναι γνωστό, κάθε συστατικό έχει διαφορετική 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. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι στα επίπεδα της TAC στο πάγκρεας των χοίρων της ομάδας whey σε σχέση με την ομάδα control, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση (29,33% και 60,38% στις 35 και στις 50 ημέρες). Αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος, ενεργοποιεί τους μηχανισμούς της αντιοξειδωτικής άμυνας σε αυτόν τον ιστό με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στους υπόλοιπους ιστούς (νεφρός, πνεύμονας, στομάχι) δεν σημειώνεται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Από τα αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα χοιρίδια 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 και μορίων.

Τέλος, η μέτρηση των **πρωτεϊνικών καρβονυλίων** μας υποδηλώνει το ποσοστό οξείδωσης που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες των ιστών εξαιτίας της δράσης των ελεύθερων ριζών. Ουσιαστικά η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών προκύπτει από την τροποποίηση ενός μεγάλου φάσματος αμινοξέων, όπως η προλίνη, η αργινίνη, η θρεονίνη και η λυσίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στον νεφρό, στον στόμαχο και στο πάγκρεας των ζώων 50 ημερών. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στους προαναφερθέντες ιστούς η ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας (GSH και CAT) παρείχε προστασία από την οξείδωση των πρωτεϊνών. Δηλαδή, στον νεφρό, στον στόμαχο και στο πάγκρεας παρατηρούμε ότι η επίδραση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος είναι ευεργετική καθώς μειώνεται η οξείδωση των πρωτεϊνών. 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 υπεροξείδωσης 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 οξείδωσης των πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα που σχηματίζονται με την οξείδωση 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 οξείδωση 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).

Άξιο 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 σε κάποιους ιστούς και ιδιαίτερα στον στομαχικό. 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.

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, βοηθάει σημαντικά στη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών που ελέγχθηκαν (νεφρός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας). 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 δραστικότητα 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. 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. Βέβαια, είναι αναγκαίο στο εγγύς μέλλον να πραγματοποιηθούν και άλλες τέτοιου είδους μελέτες και σε άλλα ζώα που θα εδραιώσουν τις προαναφερθείσες ευεργετικές ιδιότητες της πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Τέλος, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία κοπράνων ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος στην υγεία του εντέρου, καθώς και προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων του κρέατος (μέθοδος HPLC-MS) για να εξάγουμε συμπεράσματα της επίδρασής τους στην ποιότητα του κρέατος.

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
- 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
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*, 18: 325-332
- 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.
- 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
- Aurousseau B, Gruffat D, Durand D (2006). Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 601-620
- Basu S, Eriksson M, (2001) Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 30: 265–269
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Battin, T.J., Luysaert, S., Kaplan, L.A., Aufdenkampe, A.K., Richter, A., Tranvik, L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*.
- Bayford 2010: whey protein- a functional food, the nutrition practitioner, spring 2010
- Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Proposed Mechanism of Catalase in Catalase: H₂O₂: H₂O₂ 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

- 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.
- 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.
- 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, Harris P.A, Schroter R.C, Kelly F.J (2004b). Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction. *Journal of Nutrition* 134, S2065– S2067.
- 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.
- 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
- Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*. 2010; 59:459–469
- Gerogianni, I., Gourgoulialis, K.i., 2006. Oxidative stress and lung diseases. *Archives of Hellenic Medicine*. 23(5), pp.444–454.
- Gilbert DL (2000). Fifty years of radical ideas, *Ann N Y Acad Sci*. 899: 1-14

- Githens S (1991) Glutathione metabolism in the pancreas compared with that in the liver, kidney, and small intestine. *Int J Pancreatol.* Feb;8(2):97-109
- Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995 41(12 Pt 2):1819-28.
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasiote 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
- 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
- Halliwell B (2001). *Free Radicals and other reactive species in Disease*, National University of Singapore
- 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, Gutteridge J.M.C (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 2. Clarendon Press, Oxford
- 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 DEHYDROASORBIC ACID BY ANIMAL TISSUES. *Nature*, 203, pp.1068–1069.
- 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
- Jain A, Flora S.J ((2012) Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J Environ Biol.* 33(2):233-8 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 LabInvest.* 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):2082-9.
- Kataria A. K, Kataria N (2012a) Evaluation of oxidative stress in sheep affected with peste des petits ruminants. *J Stress Physiol Biochem* 8(4):72-77.

Kataria A. K, Kataria N (2012b) Evaluation of oxidative stress in pigs affected with classical swine fever. *Porc Res* 2(2):35-38

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 NeuroSci.* 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

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.

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.

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.

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.

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

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.

S. Toyokuni, N. Miyake, H. Hiai, M. Hagiwara, S. Kawakishi, T. Osawa, K. Uchida The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct *FEBS Lett*, 359 (1995), pp. 189–191

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

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, pp.514–7.

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

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.

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

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

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

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