

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



**"Μελέτη του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ιστών χοιριδίων, στα οποία έχουν χορηγηθεί ζωοτροφές εμπλουτισμένες με παραπροϊόντα οινοποιίας και τυροκομίας"**

**"Study of tissue redox status in piglets supplemented with feed enriched with winery and cheese making by-products"**

**ΑΛΕΞΙΑΔΗΣ ΙΟΡΔΑΝΗΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2018**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Γρηγόριος Αμούτζιας:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την δυνατότητα που μου πρόσφερε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια αυτής.

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

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον διδάκτορα Αριστείδη Βεσκούκη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Θα ήθελα τέλος, να ευχαριστήσω ολόκληρη την ομάδα του εργαστηρίου, για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, γεγονός που κατέστησε εφικτή την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.2 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	9
1.3.1 Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	9
1.3.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	11
1.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	12
1.5 Οφέλη δραστικών μορφών οξυγόνου.....	12
1.6 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	14
1.7 Οξειδωτικό στρες.....	15
1.8 Αντιοξειδωτικά.....	18
1.9 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.....	19
1.9.1 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).....	19
1.9.2 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).....	20
1.9.3 Οξειδάση του NADPH.....	21
1.9.4 Μονοξειδίο του αζώτου (NO <sup>•</sup> ).....	23
1.9.5 Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).....	24
1.9.6 Κινάση του NAD <sup>+</sup> (NADK).....	24
1.9.7 Θειορεδοξίνη (TRX).....	26
1.9.8 Αναγωγή της θειορεδοξίνης (TRXR).....	27
1.9.9 Περοξειρεδοξίνη (Prx).....	28
1.9.10 NADH/NADPH.....	29
1.10 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein).....	31
1.10.1 Πλεονεκτήματα-αντιοξειδωτική δράση.....	32
1.11 Στέμφυλα (Grape pomace).....	33
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	35
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35

3.1 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος.....	35
3.2 Στέμφυλα.....	36
3.3 Ζώα.....	37
3.4 Πειραματική διαδικασία.....	37
3.5 Συλλογή ιστών.....	38
3.6 Ομογενοποίηση των ιστών.....	38
3.7 Πρωτόκολλα βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που μετρήθηκαν.....	38
3.7.1 Προσδιορισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford...	39
3.7.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).....	40
3.7.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του NADPH.....	42
3.7.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειρεδοξίνης.....	44
3.8 Στατιστική ανάλυση.....	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4.1 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος.....	47
4.1.A. Τετρακέφαλος μυς.....	47
4.1.B. Ήπαρ.....	49
4.2 Στέμφυλα.....	51
4.2.A. Τετρακέφαλος μυς.....	51
4.2.B. Ήπαρ.....	52
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος και τα στέμφυλα αποτελούν παραπροϊόντα της τυροκομίας και της οινοποιίας, αντίστοιχα και για το λόγο αυτό είναι επικίνδυνοι ρύποι για τα οικοσυστήματα, στα οποία απορρίπτονται. Σε αυτό το πλαίσιο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η αξιοποίησή τους για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση των χρήσιμων συστατικών τους και, τελικά, την προστασία του περιβάλλοντος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης των παραπροϊόντων αυτών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση βασικών ιστών. Έτσι, δημιουργήθηκαν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος και στέμφυλα και χορηγήθηκαν σε χοιρίδια από την 20η έως την 50η ημέρα μετά τη γέννησή τους. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 24 χοιρίδια, στα οποία πραγματοποιήθηκε λήψη του τετρακέφαλου μυός και του ήπατος την 35η και την 50η ημέρα. Οι βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν ήταν η περοξειρεδοξίνη (Ptx), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η συγκέντρωση του NADPH. Στο πείραμα χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος, η δραστηριότητα της GPx και η συγκέντρωση του NADPH βρέθηκαν αυξημένες στον τετρακέφαλο μυ ενώ η δραστηριότητα της Ptx μειώθηκε στο ίδιο διάστημα. Στο ήπαρ, οι τρεις δείκτες εμφάνισαν τάσεις αύξησης στις 35 ημέρες, ωστόσο βρέθηκαν μειωμένοι στις 50 ημέρες. Στο πείραμα χορήγησης στέμφυλων και οι 3 βιοδείκτες εμφάνισαν τάσεις μείωσης στον τετρακέφαλο μυ ειδικά στις 50 ημέρες, ενώ στο ήπαρ δεν βρέθηκαν σημαντικές επιδράσεις. Συνολικά, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτίωσε το αναγωγικό προφίλ του μυός και του ήπατος. Η πτώση της Ptx καταδεικνύει ότι, πιθανώς, το ένζυμο αυτό ανήκει στη δεύτερη γραμμή άμυνας και, λόγω της βελτίωσης της αντιοξειδωτικής ισχύος που προσέδωσε η πρωτεΐνη τυρογάλακτος στο μυ, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησής της ενώ η πτώση των τριών βιοδεικτών στο ήπαρ στις 50 ημέρες είναι ένδειξη των προσαρμογών που έχει υποστεί ο ιστός μετά από την τάση αύξησης της Ptx και του NADPH στις 35 ημέρες. Τα στέμφυλα οδήγησαν, επίσης, σε ανάπτυξη προσαρμογών στο μυ. Συμπερασματικά, τόσο η πρωτεΐνη τυρογάλακτος όσο και τα στέμφυλα βελτίωσαν το αναγωγικό προφίλ των ιστών καταδεικνύοντας ότι υπάρχει δυνατότητα εκμετάλλευσής τους ώστε να προστατευθεί το περιβάλλον από αυτούς τους ρυπογόνους παράγοντες.

## ABSTRACT

Whey protein and grape pomace are by-products of winery and cheese making, respectively and their deposition causes serious environmental problems. Nowadays, there is a growing interest regarding these by-products, since it appears that, due to their natural compounds they can potentially become beneficial as constituents of biofunctional foods. To this end, the aim of the present study was to assess the effects of these by-products on tissue redox status. Thus, feed enriched with whey protein and grape pomace was administered to piglets between the 20th and the 50th day post birth. According to the study design, 24 piglets were used and quadriceps muscle and liver were collected at two different time points, that is at days 35 and 50 post birth. Then, three redox biomarkers, namely peroxiredoxin activity (Prx), glutathione peroxidase activity (GPx) and NADPH concentration were measured. Our results in the experiment of whey protein administration showed that GPx and NADPH were increased, while Prx was decreased in muscle. In liver, all biomarkers tested exhibited a trend of increase at 35 days, yet they decreased at 50 days. Regarding the grape pomace administration experiment, all biomarkers tested showed a trend of decreased in muscle, especially at 50 days, while in liver no significant effects were observed. Overall, whey protein administration improved tissue reductive status. Specifically, the fact that Prx was found reduced indicates that this enzyme belongs probably, to the second line of tissue defense and, thus, due to the whey protein induced improvement of the antioxidant power of muscle, there is no need for its activation. Furthermore, the decline of all three biomarkers in the liver at 50 days are an outcome of the adaptations reached by the increase in Prx and NADPH at 35 days. Grape pomace administration also induced adaptations in muscle. In conclusion, both whey protein and grape pomace improved tissue redox status demonstrating that they can potentially be exploited so that the environment is protected from these pollutants.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Το οξυγόνο ( $O_2$ ) είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής καθώς συμμετέχει στη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Παρά την κρισιμότητά του για το σύνολο των ζωντανών οργανισμών, το οξυγόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες όπως η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις του, μπορεί να είναι τοξικό. Αυτές οι τοξικές ιδιότητες του οξυγόνου παρέμεναν ασαφείς μέχρι το 1954 όταν μία έρευνα υποστήριξε ότι οφείλονται σε εν μέρει ανηγμένες μορφές οξυγόνου (Gershman et. al., 1954). Λίγα χρόνια αργότερα μία ακόμη εργασία προσέδρασε έντονο ενδιαφέρον υποστηρίζοντας ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στη διαδικασία της γήρανσης (Harman, 1956). Το 1977 οι Mittal και Murad απέδειξαν ότι η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ) επάγει την ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης και το σχηματισμό της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανωσίνης (cGMP) (Mittal and Murad, 1977). Έτσι, έδειξαν ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τους οργανισμούς αλλά και ότι συμβάλλουν σε βιολογικές διεργασίες ζωτικής σημασίας. Οι παραπάνω έρευνες έδωσαν το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη των ελευθέρων ριζών. Ο ρόλος τους σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών κέντρισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να έρχονται συνεχώς στο φως νέα στοιχεία όχι μόνο για την παθογένειά τους αλλά και για την προέλευση και τις φυσιολογικές τους λειτουργίες.

### 1.2 Ελεύθερες ρίζες

Η ύλη αποτελείται από άτομα και μόρια, τα οποία περιέχουν ζεύγη ηλεκτρονίων τοποθετημένα σε στοιβάδες. Κάθε ζεύγος κινείται σε συγκεκριμένη περιοχή που ονομάζεται ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους σε αντίθετες κατευθύνσεις (spin). Το γεγονός αυτό προσδίδει σταθερότητα και διατηρεί το άτομο ή το μόριο σε χαμηλή ενεργειακή κατάσταση καθιστώντας το λιγότερο δραστικό. Ελεύθερη ρίζα ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έχει την ικανότητα αυτόνομης ύπαρξης. Η δημιουργία της προκαλείται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός



ηλεκτρονίου από την εξωτερική στοιβάδα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Η ισχυρή έλξη που ασκεί ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων ή μορίων προκαλεί χημικές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (redox reactions). Ως οξείδωση χαρακτηρίζεται η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο ενώ ως αναγωγή η προσάρτησή τους σε αυτό. Στα βιολογικά συστήματα το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μπορεί να προέρχεται από άτομο οξυγόνου, αζώτου, θείου ή χλωρίου. Έτσι, συναντώνται στη φύση οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS) και οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS). Οι ενώσεις που ανήκουν στις δραστικές μορφές δεν είναι όλες ελεύθερες ρίζες αλλά όλες οι ελεύθερες ρίζες ανήκουν στις δραστικές μορφές.

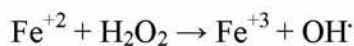
### 1.3 Παραγωγή των ελευθέρων ριζών

#### 1.3.1 Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών

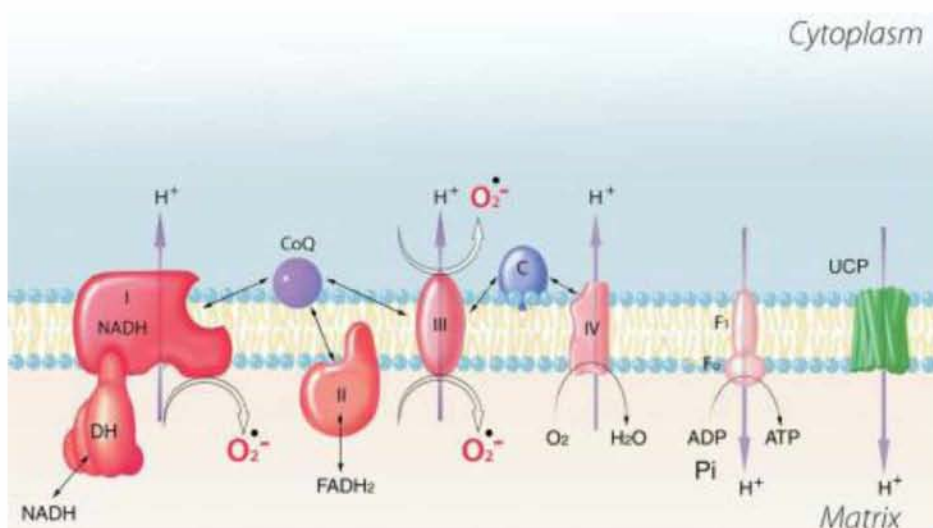
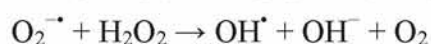
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν μέσα στον οργανισμό και η μεγαλύτερη ποσότητά τους προέρχεται από ενδογενείς βιοχημικές διεργασίες ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες από τις κύριες πηγές παραγωγής των ROS σε κυτταρικό επίπεδο.

**Οξειδωτική φωσφορυλίωση.** Η οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αποτελεί τη βασική οδό παραγωγής ενέργειας στο κύτταρο καθώς, επίσης, και τη σημαντικότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Cadenas and Sies, 1998). Η παραγωγή των ROS παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 1. Κατά τη διάρκειά της τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται σε μία αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αποτελείται από τρία πρωτεϊνικά συμπλέγματα προσκολλημένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και από δύο ελεύθερα μόρια (ουβικινόνη και κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Το μοριακό οξυγόνο, που ανάγεται σε νερό, είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων και το αποτέλεσμα αυτής της ηλεκτρονιακής μεταφοράς είναι η παραγωγή ATP (Chance et. al., 1979). Ωστόσο, περίπου το 1-3% των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναπνευστική

αλυσίδα διαφεύγουν με αποτέλεσμα το σχηματισμό ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), το οποίο αποτελεί βασική ελεύθερη ρίζα. Ακολούθως, το  $O_2^{\cdot-}$  μπορεί να οξειδώσει ένζυμα που περιέχουν σίδηρο με αποτέλεσμα την παραγωγή δισθενούς σιδήρου ( $Fe^{+2}$ ), ο οποίος ευνοεί την παραγωγή ρίζας υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ) μέσω της αντίδρασης Fenton (Valko et. al., 2005):



Άλλη οδός για το σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου είναι η αντίδραση Haber-Weiss:

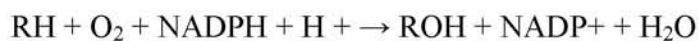


Εικόνα 1: Σχηματικό μοντέλο παραγωγής των ROS στα μιτοχόνδρια (Balaban et. al., 2005).

**Υπεροξειδιοσώματα.** Τα υπεροξειδιοσώματα είναι κυτταρικά κυστίδια που περιέχουν ένζυμα όπως η β-οξειδάση της μακράς αλυσίδας των λιπαρών οξέων και έτσι αποτελούν βασική πηγή παραγωγής δραστικών μορφών και κυρίως του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Διαθέτουν, ωστόσο, και ένζυμα όπως η καταλάση, η οποία οδηγεί σε αποδόμηση του  $H_2O_2$  διατηρώντας έτσι την κατάλληλη οξειδοαναγωγική ισορροπία (Valko et. al., 2004).

**Κυτόχρωμα P450.** Το ενζυμικό σύστημα P450 ή κυτόχρωμα P450 παίρνει μέρος σε αντιδράσεις φάσης I, έχει σαν κύρια λειτουργία τον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών και αποτελεί μία από τις κύριες οδούς μεταβολισμού των φαρμάκων. Τα

ένζυμα που αποτελούν το ενζυμικό αυτό σύμπλεγμα βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και παίζουν το ρόλο του μεταφορέα ηλεκτρονίων μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα που είναι η ξενοβιοτική ουσία. Η παραπάνω πορεία περιγράφεται από την εξής αντίδραση:



Στην πραγματικότητα και η ξενοβιοτική ουσία αλλά και τα NADH και NADPH οξειδώνονται, ενώ το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Για το λόγο αυτό το κυτόχρωμα P450 λέγεται και οξειδάση μεικτού τύπου.

**Οξειδάσες του NADPH.** Οι οξειδάσες του NADPH είναι μία οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων, για τη παραγωγή  $O_2^{\cdot-}$  ως κύριου προϊόντος. Η δράση αυτής της οικογένειας ενζύμων περιγράφεται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

**Αυτοοξειδωση.** Μόρια, τα οποία μπορούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες να αυτοοξειδωθούν και να οδηγήσουν κυρίως σε σχηματισμό  $O_2^{\cdot-}$  είναι οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες και η αιμοσφαιρίνη (Bindoli et. al., 1992, Winterbourn, 1985).

### 1.3.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

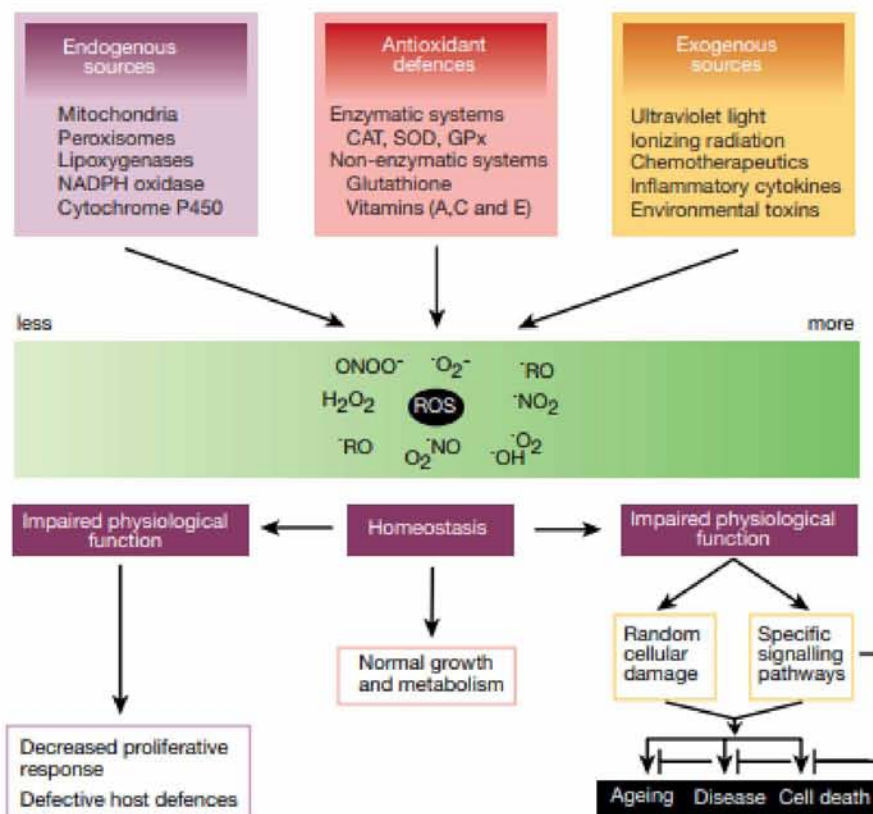
Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν και από διάφορους εξωγενείς παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση που προέρχεται από απόβλητα βιομηχανιών, εντομοκτόνα ή φυτοφάρμακα. Πολλά φάρμακα μπορεί, επίσης, να ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών καθώς, επίσης, και το κάπνισμα, το αλκοόλ, η υπερϊώδης ακτινοβολία και η άσκηση. Τέλος, η διατροφή (μη πρόσληψη αντιοξειδωτικών, κατανάλωση καπνιστών κρεάτων και ψαριών) μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Μετά την είσοδό τους στον οργανισμό οι παραπάνω ουσίες αποσυντίθενται ή μεταβολίζονται σε δραστικές μορφές (Pham-Huy et. al., 2008).

#### 1.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο όρος ROS αναφέρεται σε δραστικές μορφές οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία που παράγονται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με δραστικές μορφές οξυγόνου ή σε ενώσεις που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο, με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων. Οι ROS χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα και από σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής. Επομένως, δρουν ως οξειδωτικά, αποσπών δηλαδή ένα ηλεκτρόνιο από μόρια στόχους. Στις ROS συμπεριλαμβάνονται οι ρίζες σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), υπεροξειδίου ( $RO_2^{\cdot}$ ), αλκοξειδίου ( $RO^{\cdot}$ ), υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\cdot}$ ) καθώς και τα παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), το όζον ( $O_3$ ) και το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ) (Evans and Halliwell, 2001). Οι ROS αντιπροσωπεύουν τη σημαντικότερη κατηγορία ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς.

#### 1.5 Οφέλη των δραστικών μορφών οξυγόνου

Μία ελεγχόμενη οξειδωτική κατάσταση στο κύτταρο που επιτυγχάνεται συνήθως μέσω χαμηλής ή μέτριας συγκέντρωσης των ROS είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα, σε τέτοιες συγκεντρώσεις οι ROS δρουν ευεργετικά στην ανοσολογική απόκριση καθώς τα φαγοκύτταρα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες προκειμένου να καταστραφούν τα παθογόνα (Pham-Huy et. al., 2008). Σύμφωνα με άλλες έρευνες φαίνεται πως η φυσιολογική λειτουργία αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών βασίζεται στη δράση των ROS και επομένως διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο ως δευτεροί διαβιβαστές (Valko et. al., 2007). Οι διάφορες πηγές και κυτταρικές επιδράσεις των ROS παρουσιάζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Πηγές και κυτταρικές επιδράσεις των ROS (Finkel and Holbrook, 2000).

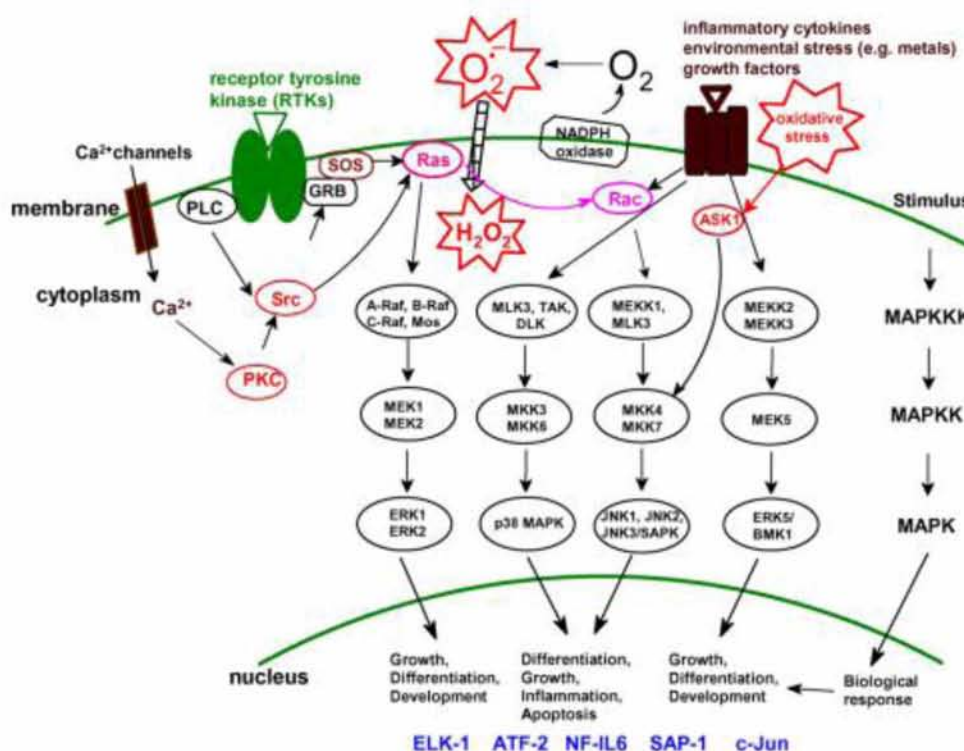
**Μονοπάτια κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων.** Φαίνεται πως ένας σημαντικός αριθμός κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF $\alpha$ ), η ιντερφερόνη  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) οδηγούν σε αύξηση της ενδοκυττάριας παραγωγής ROS. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει ότι οι ROS δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι συμμετέχοντας σε απαραίτητες κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Valko et. al., 2007).

**Μεταγραφικοί παράγοντες.** Έχει δείχτεί ότι οι ROS συμμετέχουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση και πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι ROS συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B που συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, της AP-1 που είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση και του p53, η



δυσλειτουργία του οποίου σχετίζεται με διάφορες μορφές καρκίνου (Valko et. al., 2007).

**Κινάσες σερίνης/θρεονίνης.** Οι ROS επάγουν την απελευθέρωση ασβεστίου από ενδοκυτταρικές πηγές οδηγώντας στην ενεργοποίηση κινασών, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία είναι μέλος της οικογένειας των κινασών σερίνης/θρεονίνης (Parekh and Penner, 1997). Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης της οικογένειας MAPK (εικόνα 3) ρυθμίζονται από τη δράση των ROS (Kyriakis and Avruch, 2001).



Εικόνα 3: Μονοπάτια MAPK που επάγονται από ROS (Valko et. al., 2007).

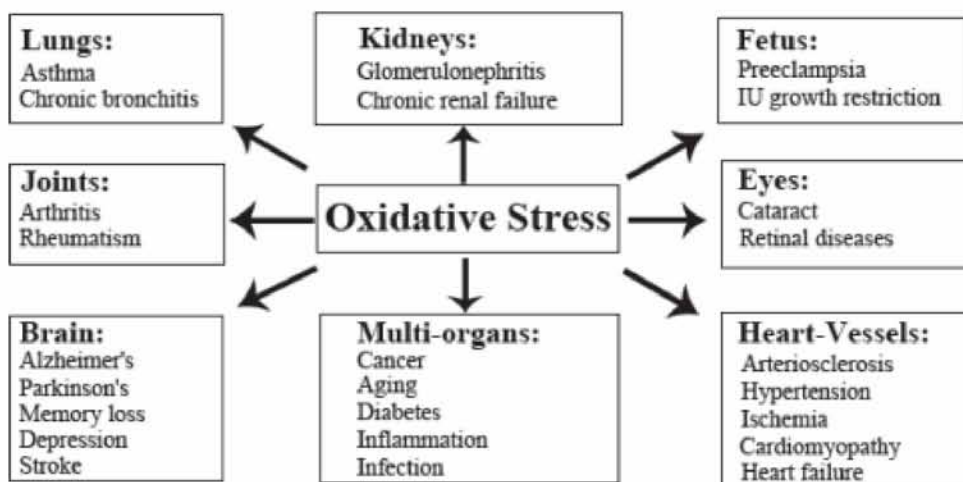
## 1.6 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις δραστικές μορφές αζώτου συμπεριλαμβάνονται το μονοξειδίο του αζώτου (NO<sup>•</sup>) και το διοξειδίο του αζώτου (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), τα οποία φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα και επομένως είναι ρίζες, αλλά και τα NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> και N<sub>2</sub>O, τα οποία δεν είναι ρίζες. Στους οργανισμούς το NO<sup>•</sup>

σχηματίζεται από το ανιμοξύ L-αργινίνη μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από τις συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το NO<sup>•</sup> είναι μικρό, σχετικά υδρόφοβο μόριο που μπορεί να διαπερνά τις περισσότερες κυτταρικές μεμβράνες χωρίς να αντιδρά και μπορεί να μετατραπεί σε ισχυρά οξειδωτικά διαμέσου αντιδράσεων με άλλα μόρια. Βάσει των παραπάνω ιδιοτήτων, το NO<sup>•</sup> καθίσταται κατάλληλο μόριο για τη διακυτταρική επικοινωνία. Η βιοσύνθεση σχετικά μικρών ποσοτήτων NO<sup>•</sup> από τις eNOS (ενδοθηλιακές συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου) και nNOS (νευρονικές συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου) φαίνεται πως συμβάλει στις φυσιολογικές δράσεις του NO<sup>•</sup> στο αγγειακό, νευρικό και ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ αυξημένη παραγωγή του από τις iNOS (επαγόμενες συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου) πιθανώς σχετίζεται με τη τοξικότητά του εναντίον των κυττάρων του ίδιου του οργανισμού (Cuzzocrea et. al., 2001).

### 1.7 Οξειδωτικό στρες

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών (π.χ. δραστικές μορφές) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων ονομάζεται οξειδωτικό στρες και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές οξειδωτικές τροποποιήσεις στα βιομόρια (Sies, 1985). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι αποτέλεσμα μειωμένης σύνθεσης ή λειτουργίας ενδογενών αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (π.χ. λόγω μεταλλάξεων) ή μειωμένης διαιτητικής πρόσληψης αντιοξειδωτικών ουσιών (π.χ. βιταμίνης C). Τις περισσότερες φορές ωστόσο, το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα αυξημένης παραγωγής των δραστικών μορφών, η οποία μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, όπως η έκθεση σε ακτινοβολία ή η χορήγηση φαρμάκων. Σε περιπτώσεις που οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται ενδοκυτταρικά, μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν τροποποιήσεις σε βασικά κυτταρικά μόρια. Οξείδωση τέτοιων μορίων, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες ή τα λιπίδια μπορεί να οδηγήσει σε τροποποιήσεις με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Κάποια από τα φαινόμενα που προκύπτουν λόγω του οξειδωτικού στρες απεικονίζονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Ασθένειες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες (Pham-Huy et. al., 2008).

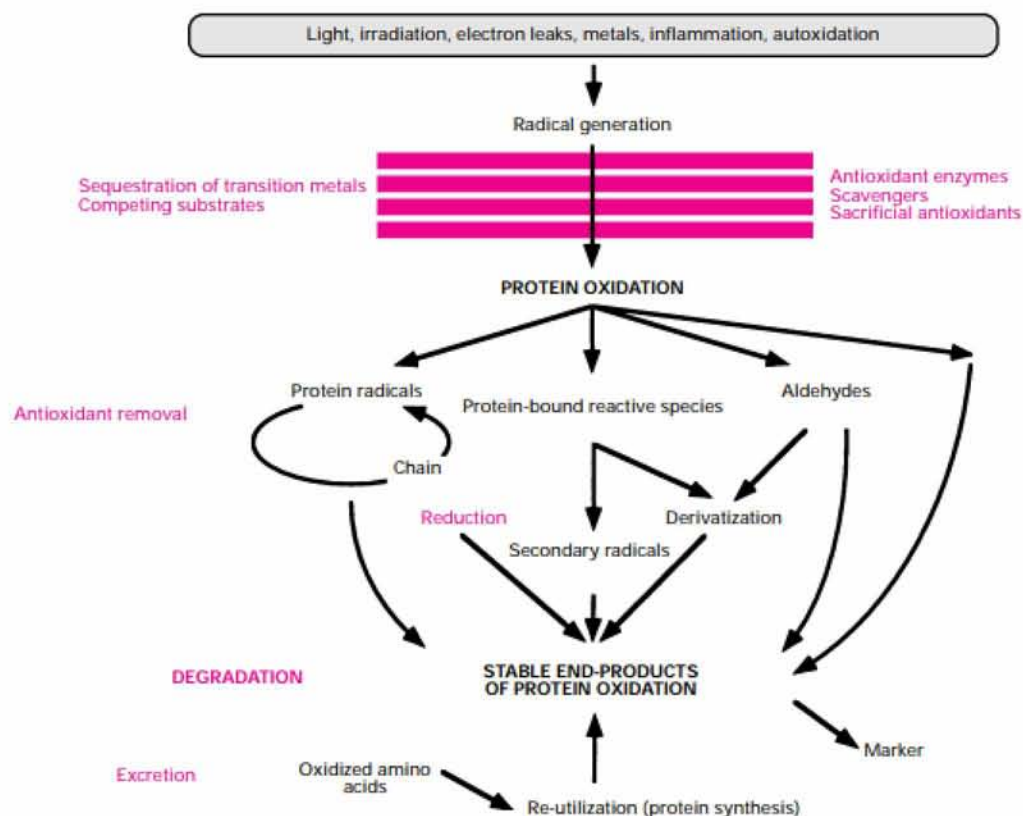
**Λιπιδική υπεροξειδωση.** Η δημιουργία μίας ελεύθερης ρίζας στα λιπίδια μπορεί να εκκινήσει έναν καταράκτη αντιδράσεων που θα οδηγήσουν στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ο συγκεκριμένος όρος αναφέρεται στην οξειδωτική βλάβη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, δηλαδή των οξέων που φέρουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς στο μόριό τους. Η λιπιδική υπεροξειδωση λαμβάνει χώρα φυσιολογικά σε μικρό βαθμό σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, ενώ καταστάσεις που την διεγείρουν πέραν του φυσιολογικού είναι η υποξία, η τοξικότητα του χαλκού ή του σιδήρου και οι διαταραχές στην αντιοξειδωτική άμυνα (Mylonas and Kouretas, 1999).

**Βλάβες στο DNA.** Το DNA και το RNA αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά του κυττάρου και φαίνεται πως είναι αρκετά ευάλωτα στη δράση των ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται *in vivo*. Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των νουκλεϊκών οξέων οδηγούν σε αναστολή της μεταγραφής και του διπλασιασμού του DNA, προκαλούν μεταλλάξεις και, τελικά, μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο (Halliwell, 1998). Οξειδωτικές βλάβες στο DNA ανιχνεύονται ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ενώ οι βλάβες που παρατηρούνται στο μιτοχondριακό DNA είναι κατά πολύ περισσότερες από αυτές που παρατηρούνται στο πυρηνικό. Πιστεύεται ότι η κύρια υπεύθυνη για τις βλάβες του DNA είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>), η οποία είναι εξαιρετικά δραστική και αντιδρά σχεδόν με οποιοδήποτε μόριο βρίσκεται δίπλα της κατά τη στιγμή της δημιουργίας της. Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε μία σειρά διαφορετικών



αποτελεσμάτων, όπως η σχάση μονών και διπλών αλυσίδων, η ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων, οι συνδέσεις τύπου DNA-DNA ή DNA- πρωτεΐνης και οι τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA από τις οποίες πιο ευαίσθητες είναι οι πυριμιδίνες (κυτοσίνη και θυμίνη) (Slupphaug et. al., 2003).

**Οξείδωση πρωτεϊνών.** Υψηλά επίπεδα των δραστικών μορφών μπορούν να οδηγήσουν σε χημικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτές είτε μη αντιστρεπτές (Ghezzi and Bonetto, 2003). Στις μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις ανήκουν η νίτρωση και η καρβονυλίωση, που σχετίζονται με μόνιμες βλάβες της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που υφίστανται κάποια από τις παραπάνω τροποποιήσεις, είτε οδηγούνται σε αποικοδόμηση είτε συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα. Οι αντιστρεπτές τροποποιήσεις είναι η νιτροσουλίωση και η γλουταθειονυλίωση, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ισορροπία (Dean et. al., 1997, Giasson et. al., 2002). Πιθανοί μηχανισμοί πρωτεϊνικής οξείδωσης παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

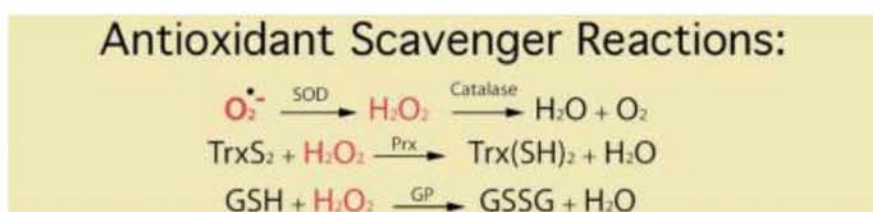


Εικόνα 5: Εκτιμώμενοι μηχανισμοί πρωτεϊνικής οξείδωσης *in vivo* (Dean et. al., 1997).

Οι επιπτώσεις που θα έχει η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Τα αμινοξέα που είναι πιο ευαίσθητα είναι η κυστεΐνη, η τρυπτοφάνη, η μεθειονίνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η φαινυλαλανίνη. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό καταστροφής μίας πρωτεΐνης από τη δράση των ελευθέρων ριζών είναι το κατά πόσο σημαντικά είναι αυτά τα αμινοξέα για τη δομή και τη λειτουργία της (π.χ. αν βρίσκονται στο ενεργό της κέντρο ή κοντά σε αυτό) καθώς και η ικανότητα του κυττάρου να επιδιορθώνει τις βλάβες (Davies, 2003). Βλάβες σε ένζυμα, υποδοχείς ή πρωτεΐνες που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία του οργανισμού, ενώ βλάβες σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε επαγωγή μεταλλάξεων.

### 1.8 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό είναι κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες, οι οποίες εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελευθέρων ριζών, προστατεύουν το κύτταρο από την τοξική τους δράση και συμβάλλουν στην πρόληψη ασθενειών. Τα αντιοξειδωτικά που παράγει ο οργανισμός διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά (Pham-Huy et. al., 2008). Συγκεκριμένα, συμβάλλουν ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το μοριακό οξυγόνο σε άλλα μόρια, σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες και τερματίζουν τις αντιδράσεις που επάγονται από αυτές. Τα βασικά μονοπάτια εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών απεικονίζονται στην εικόνα 6.



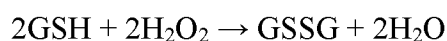
Εικόνα 6: Κύρια μονοπάτια απομάκρυνσης των ROS (Balaban et. al., 2005).

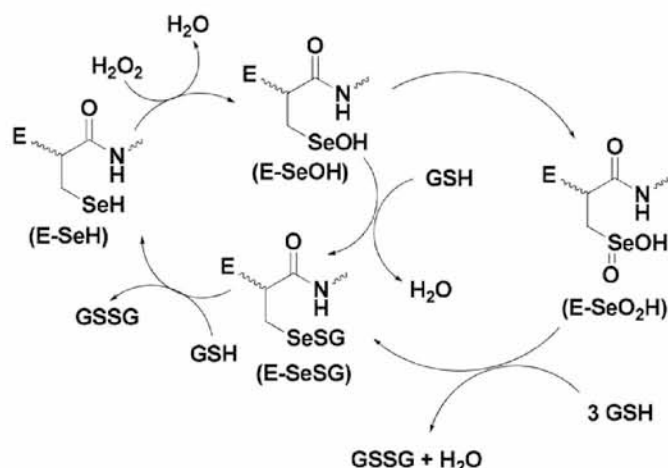
Στις ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες συμπεριλαμβάνονται η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η καταλάση (CAT) και οι θειορεδοξίνες (TRXs). Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται στα ενδογενή, τα οποία παράγονται από τον οργανισμό και σε εκείνα, τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός και τα προσλαμβάνει μέσω της τροφής. Στα ενδογενή ανήκουν το λιποϊκό οξύ, η γλουταθειόνη, η L-αργινίνη, το συνένζυμο Q10, η μελατονίνη και το ουρικό οξύ. Οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και τα λιπαρά οξέα ωμέγα 3 και 6 ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία (Pham-Huy et. al., 2008).

## **1.9 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες**

### **1.9.1 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**

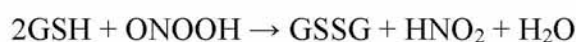
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων των λιπιδίων (ROOH) σε νερό ( $H_2O$ ) και αλκοόλη αντίστοιχα χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως δότη ηλεκτρονίων. Η GSH στη συνέχεια οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) (Bjornstedt et al., 1997). Η πορεία αυτή παρουσιάζεται στην εικόνα 7 και περιγράφεται με τις παρακάτω αντιδράσεις:





Εικόνα 7: Προτεινόμενος μηχανισμός αναγωγής του  $\text{H}_2\text{O}_2$  από την GPx (Debasish and Govindasamy, 2015).

Επίσης, η GPx ανάγει και το υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $\text{ONOOH}$ ) σε νιτρώδες οξύ, χρησιμοποιώντας την GSH ως δότη ηλεκτρονίων (Arteel et al., 2001), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

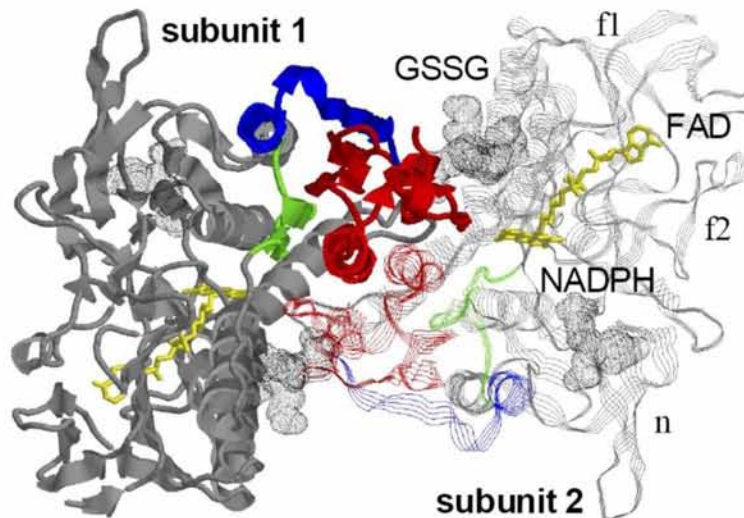


Οι περισσότερες GPx είναι τετραμερή ένζυμα των οποίων κάθε μονομερές έχει μέγεθος 22 kDa και περιέχει μία σελινοκυστεΐνη στο ενεργό κέντρο. Η σελινοκυστεΐνη παίρνει μέρος άμεσα στη δωρεά ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα του υπεροξειδίου, το οποίο οξειδώνεται (Wendel, 1980). Υπάρχουν 8 ισοένζυμα GPx, εκ των οποίων τα GPx 1-4 των θηλαστικών είναι σελινοπρωτεΐνες με μία σελινοκυστεΐνη στο καταλυτικό τους κέντρο ενώ η GPx 6 είναι σελινοπρωτεΐνη που βρίσκεται μόνο στους ανθρώπους (Brigelius-Flohe et. al., 2012).

### 1.9.2 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης, η δομή της οποίας παρουσιάζεται στην εικόνα 8, είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή της GSSG στην GSH συμβάλλοντας στη διατήρηση της κατάλληλης ισορροπίας ανάμεσα στις GSH και GSSG στο εσωτερικό του κυττάρου, μία αναλογία που φυσιολογικά είναι υψηλή (Couto et. al., 2016).





Εικόνα 8: Απεικόνιση της αναγωγής της γλουταθειόνης του ανθρώπου (Kamerbeek et. al., 2007).

Η GR διαθέτει δύο υψηλά διατηρημένες υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από μία περιοχή σύνδεσης του ανηγμένου φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH), μία περιοχή δέσμευσης του φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD) και μία περιοχή επαφής των δυο υπομονάδων. Η GR χρησιμοποιεί το FAD ως συνένζυμο ενώ το NADPH χρησιμοποιείται ως αναγωγικό μέσο. Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ δυο καταλοίπων κυστεΐνης που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που δημιουργούνται αλληλεπιδρούν και ανάγουν την GSSG σε GSH ενώ ξανασηματίζεται η δισουλφιδική γέφυρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ενεργότητα της αναγωγής της γλουταθειόνης εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα έχει εντοπιστεί, ωστόσο, τόσο στα μιτοχόνδια όσο και στον πυρήνα (Halliwell and Gutteridge, 2015).

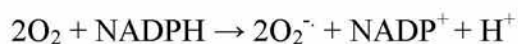
Η παραπάνω αντίδραση περιγράφεται ως εξής:



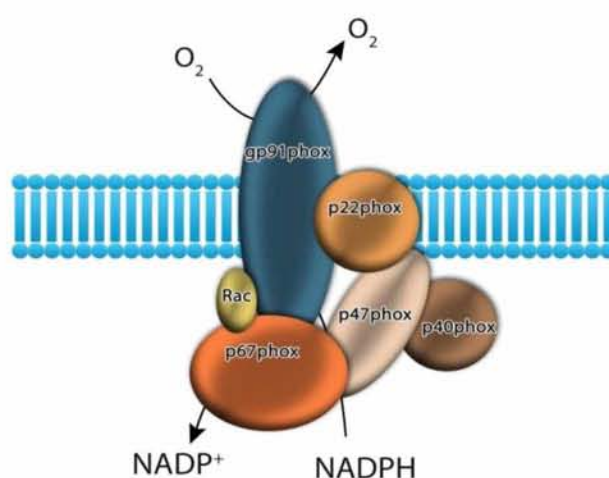
### 1.9.3 Οξειδάση του NADPH

Οι οξειδάσες του NADPH είναι ομάδα ενζύμων που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και βρίσκονται σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Η δομή της NADPH οξειδάσης φαίνεται στην εικόνα 9. Η χημική αντίδραση που καταλύουν έχει ως

αποτέλεσμα τη δημιουργία  $O_2^{\cdot -}$ , και το οποίο αποτελεί το αναγκαίο πρωταρχικό μόριο για την περαιτέρω παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου από το  $O_2$  και χρησιμοποιώντας το NADPH ως δότη ηλεκτρονίου (Babior, 1999). Η παραπάνω πορεία περιγράφεται από την εξής αντίδραση:



Οι συνηθέστερες ονομασίες που χρησιμοποιούνται για όλους τους τύπους NADPH οξειδάσων είναι PHOX από το **P**Hagocytic **O**Xidase ή NOX από το **N**ADPH **O**Xidases

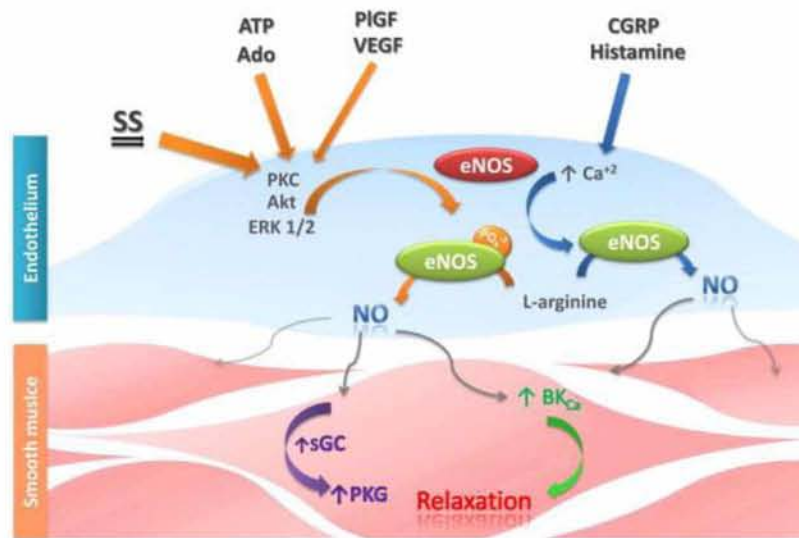


Εικόνα 9: Η δομή της NADPH οξειδάσης (Ray et al., 2005).

Από τα καλύτερα μελετημένα ένζυμα της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι η NADPH οξειδάση των λευκοκυττάρων, η οποία αφορά φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μακροφάγα) και τα Β λεμφοκύτταρα για τα οποία η δράση αυτού του ενζύμου είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση της μη ειδικής άμυνας του οργανισμού ενάντια στους μικροοργανισμούς. Η απότομη αύξηση της κατανάλωσης  $O_2$ , που χαρακτηρίζεται με τον όρο αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst), οδηγεί στην ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH συνοδευόμενη από αύξηση της παραγωγής  $O_2^{\cdot -}$  στον εξωκυττάριο χώρο και στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων (Vignais, 2002, Babior, 2004). Το αποτέλεσμα της παραπάνω διεργασίας είναι η παραγωγή ROS, οι οποίες χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα για την εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών (Babior, 1999).

#### 1.9.4 Μονοξειδίο του αζώτου (NO<sup>•</sup>)

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO<sup>•</sup>) είναι ένα μικρό μόριο που διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και ως εκ τούτου αποτελεί μία δραστική ελεύθερη ρίζα. Το NO<sup>•</sup> συντίθεται σε βιολογικούς ιστούς από ειδικές συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOSs), οι οποίες μεταβολίζουν την L-αργινίνη σε L-κιτροουλίνη οδηγώντας τελικά σε σχηματισμό NO<sup>•</sup> μέσω μιας αντίδρασης οξειδωσης παρουσία O<sub>2</sub> (Ghafouriifar et. al., 2005). Το NO<sup>•</sup> δρα ως σηματοδοτικό μόριο σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η νευροδιαβίβαση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων (εικόνα 10) και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Bergendi et. al., 1999). Η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών αζώτου, κύρια πηγή των οποίων είναι το NO<sup>•</sup> και της εξουδετέρωσής τους ονομάζεται nitrosative stress (Benhar, 2018). Το NO<sup>•</sup> παίρνει μέρος κυρίως σε τρεις μηχανισμούς: (1) σε αντιδράσεις με την αίμη της αιμοσφαιρίνης και γενικά σε αντιδράσεις με πρωτεΐνες με ομάδες που περιέχουν μέταλλα, (2) σε οξειδοαναγωγικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών και (3) σε αντιδράσεις με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Pacher et. al., 2007).

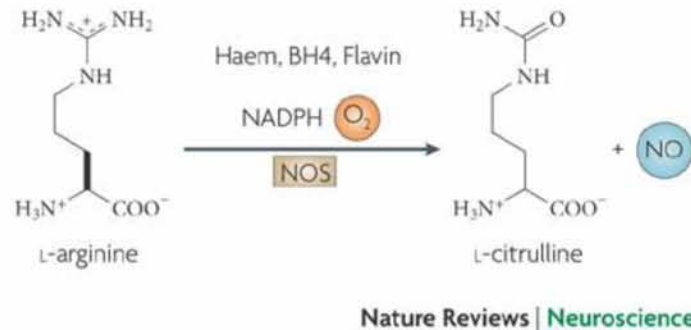


Εικόνα 10: Ρόλος του NO στη χάλαση αγγείου (Krause et. al., 2011).



### 1.9.5 Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)

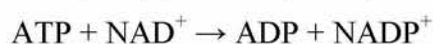
Η κυτταρική σύνθεση του NO<sup>•</sup> καταλύεται από διάφορες ισομορφές του ένζυμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), τρεις από τις οποίες είναι καλά μελετημένες. Κάθε ισoenζυμο καταναλώνει L-αργινίνη και παράγει ίσες ποσότητες L-κιτροουλίνης και NO<sup>•</sup> παρουσία O<sub>2</sub>. Η βιοσύνθεση της NO συνθάσης φαίνεται στην εικόνα 11. Αν και η έκφραση αυτών των ενζύμων δεν είναι ιστο-ειδική, δύο ισομορφές χαρακτηρίζονται ως nNOS (νευρωνική) και eNOS (επιθηλιακή) και η δραστηριότητά τους ρυθμίζεται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου και της καλμοδουλίνης. Όσον αφορά την iNOS (επαγωγική), καθώς αυτή σχηματίζει σύμπλοκο με την καλμοδουλίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου η δραστηριότητά της δεν εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης του ασβεστίου. Αντιθέτως, η έκφρασή της ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο από σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Ghafourifar et. al., 2005, Kleinert et. al., 2004).



Εικόνα 11: Παραγωγή NO από τη NO συνθάση (Calabrese et. al., 2007).

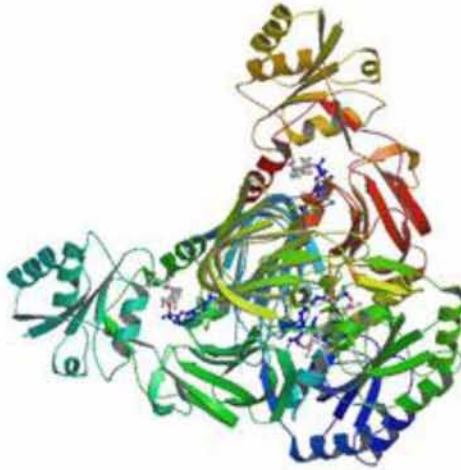
### 1.9.6 Κινάση του NAD<sup>+</sup> (NADK)

Το ένζυμο NADK είναι μία κινάση που μετατρέπει το NAD<sup>+</sup> σε NADP<sup>+</sup> μέσω φωσφορυλίωσης αποσπώντας μία φωσφορική ομάδα από ένα μόριο ATP. Η παραπάνω πορεία απεικονίζεται στην εικόνα 12 και περιγράφεται από την εξής αντίδραση (Liu et. al., 2005):







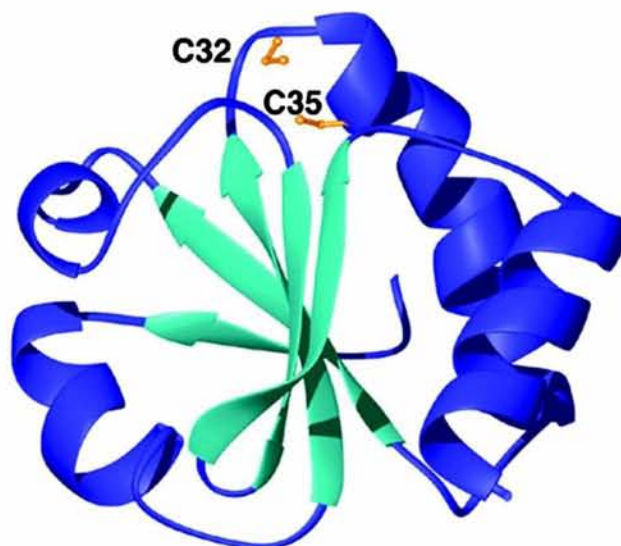


Εικόνα 13: Η δομή της NADK (Liu et. al., 2005).

### 1.9.7 Θειορεδοξίνη (TRX)

Οι θειορεδοξίνες είναι μικρές, οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Το ενεργό κέντρο της θειορεδοξίνης αποτελείται από δύο οξειδωμένες γειτονικές κυστεΐνες που μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ μίας ενεργής μορφής διθειόλης (ανηγμένη μορφή TRX-SH<sub>2</sub>) και μίας οξειδωμένης δισουλφιδικής μορφής (TRX-S<sub>2</sub>). Η δομή της παρουσιάζεται στην εικόνα 14. Στην ενεργή μορφή της η θειορεδοξίνη δρα ως αναγωγικός παράγοντας εξουδετερώνοντας τις ROS και διατηρώντας άλλες πρωτεΐνες στην ανηγμένη τους κατάσταση (Holmgren, 1989). Η οξειδοαναγωγική ενεργότητα της θειορεδοξίνης μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη δρα ως φορέα ηλεκτρονίων παρέχοντας αναγωγικά ισοδύναμα για τους καταλυτικούς κύκλους βιοσυνθετικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στη δεύτερη κατηγορία προστατεύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες από συσσωμάτωση και απενεργοποίηση λόγω σχηματισμού διαμοριακών δισουλφιδίων. Πέρα από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες φαίνεται ότι έχουν και άλλες λειτουργίες και συγκεκριμένα επιδρούν στην ανοσολογική απόκριση και συμβάλλουν στον έλεγχο της ικανότητας πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NFκ-B (Arner and Holmgren, 2000). Στα θηλαστικά έχουν ανακαλυφθεί δύο κατηγορίες θειορεδοξίνης. Στη πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται αυτές που φέρουν μόνο την τυπική αναδίπλωση θειορεδοξίνης και στη δεύτερη αυτές που συγχωνεύουν περιοχές όμοιες των TRX με άλλες περιοχές

(Miranda-Vizuite et. al., 2001). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ισομορφές TRX1 (κυτταροπλασματική/πυρηνική) και TRX2 (μιτοχονδριακή) (Arner and Holmgren, 2000).



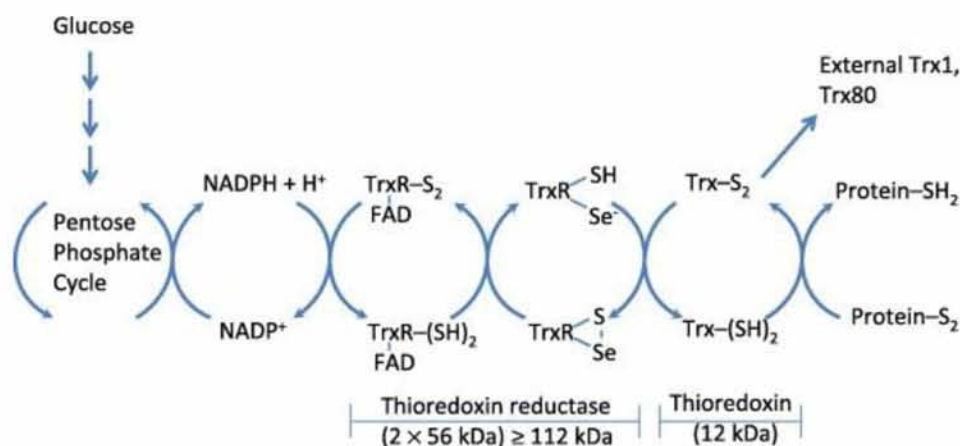
Εικόνα 14: Η δομή της θειορεδοξίνης στο *Escherichia coli* (Kumar et. al., 2004).

### 1.9.8 Αναγωγή της θειορεδοξίνης (TRXR)

Οι αναγωγάσες των θειορεδοξινών ανήκουν στην κατηγορία των οξειδοαναγωγασών των δισουλφιδίων των νουκλεοτιδίων και σε αυτές ανήκουν η αναγωγή της θειορεδοξίνης και η αφυδρογονάση των λιποαμιδίων. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα από το NADPH μέσω του FAD και ενός N-τελικού δισουλφιδικού ενεργού κέντρου (Gilbert, 1990). Στη φύση έχουν βρεθεί δύο κύριες μορφές TRXRs που αποτελούν ουσιαστικά δύο διαφορετικές δομές ενζύμων που ανάγουν την TRX. Τα βακτήρια, τα αρχαία, τα φυτά και οι περισσότεροι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν μία μικρή, μη σεληνοπρωτεϊνική TRXR, ενώ τα θηλαστικά έχουν μία μεγαλύτερη, σεληνοπρωτεϊνική TRXR (Arner and Holmgren, 2000). Σε αντίθεση με την βακτηριακή TRXR, αυτή των θηλαστικών είναι αρκετά όμοια με την αναγωγή της γλουταθειόνης όσον αφορά τη δομή και τη λειτουργία της με κύρια διαφορά ότι διαθέτει μία επιπλέον C-τελική περιοχή περίπου 16 επιπλέον αμινοξέων, που περιέχει ένα επιπλέον οξειδοαναγωγικά ενεργό μοτίβο (Arscott et. al., 1997). Στα θηλαστικά



έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί τρεις ισομορφές των TRXRs, η κυτταροπλασματική (TRXR1), η μιτοχονδριακή (TRXR2) και η TRXR που καταλύει τόσο την αναγωγή της TRX όσο και της GSSG, χαρακτηρίζεται ως αναγωγάση θειορεδοξίνης γλουταθειόνης (TGR) και εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις. Και οι τρεις ισομορφές περιέχουν τις ίδιες δομικές περιοχές και χαρακτηρίζονται από την παρουσία Sec (ανάλογο της κυστεΐνης που αντί για θείο περιέχει σελήνιο) στο C-τελικό ενεργό κέντρο. (Miranda-Vizuete et. al., 1999). Ο καταλυτικός μηχανισμός των TRXRs των θηλαστικών φαίνεται στην εικόνα 15 και περιλαμβάνει την αναγωγή της TRX με τη συμμετοχή του NADPH. Αρχικά, το ηλεκτρόνιο μετακινείται από το NADPH μέσω του FAD στο δισουλφίδιο του ενεργού κέντρου που σχηματίζεται από τις κυστεΐνες στις θέσεις 59 και 64 στην N-τελική περιοχή. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια από τη σχηματισμένη διθειόλη της μίας υπομονάδας του ενζύμου μετακινούνται στο σεληνυλο-σουλφίδιο της C-τελικής αλληλουχίας της άλλης υπομονάδας (Zhong et. al., 2000).

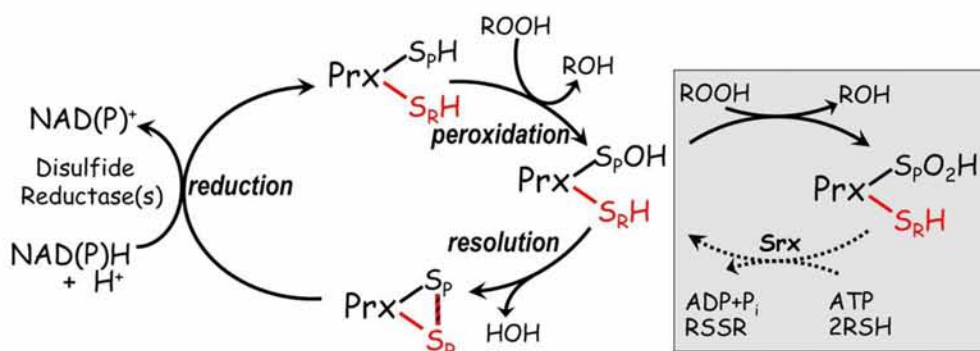


Εικόνα 15: Αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που καταλύονται από το σύστημα θειορεδοξίνης (Holmgren and Lu, 2010).

### 1.9.9 Περοξειρεδοξίνη (Prx)

Οι περοξειρεδοξίνες είναι μία μεγάλη οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων, με μεγάλο βαθμό συντήρησης και οι οποίες ανάγουν υπεροξειδία. Φέρουν μία συντηρημένη κυστεΐνη (C<sub>p</sub>) και μία δεύτερη, σε μικρότερο βαθμό συντηρημένη κυστεΐνη (C<sub>R</sub>). Καθώς η C<sub>p</sub> είναι απαραίτητη για όλες τις Prxs, η θέση που

εντοπίζεται η  $C_R$  ή η απουσία της είναι το κριτήριο για την ταξινόμηση των διαφόρων Prxs σε υποοικογένειες. Οι Prxs διακρίνονται στις 2-Cys, στις atypical 2-Cys και στις 1-Cys υπεροξειρεδοξίνες (Rhee et. al., 2001). Ο καταλυτικός κύκλος των Prxs, ο οποίος φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 16, εμφανίζει ορισμένες διαφορές ανάλογα με την υποοικογένεια. Οι 2-Cys είναι ομοδιμερή ένζυμα με δύο συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, τα  $C_p$  και  $C_R$ , ένα στην κάθε υπομονάδα. Το κατάλοιπο  $C_p$  είναι το σημείο που λαμβάνει χώρα η οξείδωση από τα υπεροξείδια για τη μετατροπή του  $C_p$ -SH σε  $C_p$ -SOH, το οποίο ακολούθως αντιδρά με το  $C_R$ -SH της άλλης υπομονάδας με αποτέλεσμα το σχηματισμό δισουλφιδίου μεταξύ των υπομονάδων. Στις atypical 2-Cys το  $C_p$ -SOH αντιδρά με το  $C_R$ -SH της ίδιας υπομονάδας για το σχηματισμό δισουλφιδίου ενώ οι 1-Cys απουσία του καταλοίπου  $C_R$  σχηματίζουν δισουλφίδιο με το  $C_R$ -SH να προέρχεται από άλλες πρωτεΐνες ή άλλα μόρια. Σε κάθε περίπτωση το δισουλφίδιο που προκύπτει ανάγεται παρουσία κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων (Fischer, 2011). Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί έξι ισομορφές περοξειρεδοξινών (PrxI έως PrxVI), από τις οποίες οι PrxI έως PrxIV συγκαταλέγονται στις 2-Cys, η PrxV συγκαταλέγεται στις atypical 2-Cys, ενώ η PrxVI συμπεριλαμβάνεται στις 1-Cys (Rhee et. al., 2001).

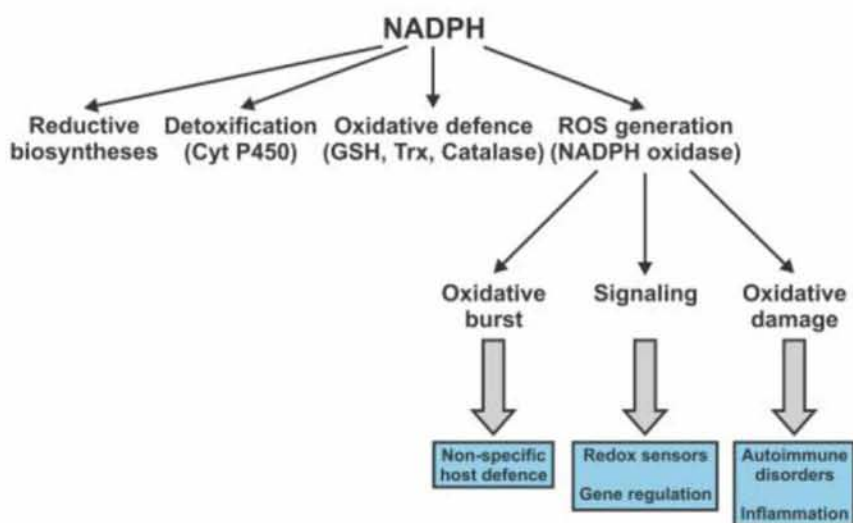


Εικόνα 16: Καταλυτικός κύκλος των 2-Cys Prxs (Personage et. al. 2008).

### 1.9.10 NADH/NADPH

Το νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (NADH) καθώς και η φωσφορυλιωμένη του μορφή (NADPH) είναι δύο μόρια που εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς και διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο ως συνένζυμα σε θεμελιώδεις καταβολικές και αναβολικές διαδικασίες, αντίστοιχα (Aglødal et. al.,

2010). Οι βασικότερες λειτουργίες των παραπάνω μορίων που απεικονίζονται στην εικόνα 17 είναι η αποτοξικοποίηση (μέσω αναγωγής του κυτοχρώματος P450), η βιοσύνθεση (κυρίως λιπαρών οξέων και αμινοξέων), η κυτταρική σηματοδότηση (μέσω τροποποίησης μορίων στόχων ή ασβεστιο-εξαρτώμενων μονοπατιών), η ανοσολογική άμυνα (ως υπόστρωμα της NADPH οξειδάσης των μακροφάγων), η γονιδιακή έκφραση και η επιδιόρθωση του DNA (Agledal et. al., 2010, Nikiforov et. al., 2015, Lin et. al., 2003, Liou et. al., 2005). Το NADPH είναι η ανηγμένη μορφή του  $\text{NADP}^+$  και αποτελεί ένα σημαντικό υποκυτταρικό αναγωγικό παράγοντα, ο οποίος συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών διαδικασιών, όπως ο μεταβολισμός, η αντιοξειδωτική άμυνα και η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Kourtzidis et. al., 2016). Τα κυτταρικά αποθέματα του NADPH ανακυκλώνονται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και αυτό συμμετέχει κυρίως σε αναβολικά μονοπάτια, όπως η βιοσύνθεση λιπιδίων, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες (Agledal et. al., 2010).



Εικόνα 17: Λειτουργίες του NADPH (Agledal et. al., 2010).

Το NADH αποτελεί την ανηγμένη μορφή του  $\text{NAD}^+$ , ενός συνεχζύμου που εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα. Το NADH ως αναγωγικός παράγοντας είναι δότης ηλεκτρονίων και σε φυσιολογικές συνθήκες η οξειδωμένη του μορφή ( $\text{NAD}^+$ ) εντοπίζεται σε μεγαλύτερη αναλογία από την ανηγμένη. Το NADH συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, το μεταβολισμό και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, με βασικότερες τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που αποτελούν





Πρωτεΐνες του τυρογάλακτος:

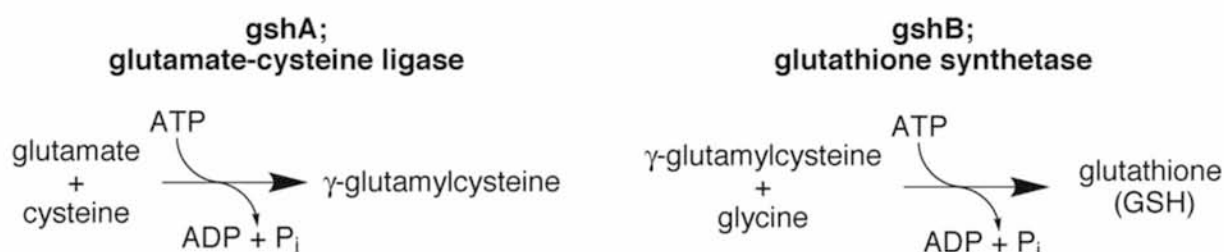
1. Β-Λακτοσφαιρίνη. Είναι η κύρια πρωτεΐνη του τυρογάλακτος και πηγή απαραίτητων αμινοξέων. Συμβάλλει στη μείωση της πίεσης του αίματος καθώς εμποδίζει τη συστολή των αγγείων μέσω της αναστολής της ACE (Ενζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης – βασικό συστατικό του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης) (Pihlanto-Leppala et. al., 2000).
2. α-Λακταλβουμίνη. Αποτελεί πηγή απαραίτητων αμινοξέων και συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες μέσω της δέσμευσης του σιδήρου (Ha and Zemel, 2003).
3. Λακτοφερίνη. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 689 αμινοξέων που η αντιμικροβιακή της δράση έγκειται στη δέσμευση του απαραίτητου για τους μικροοργανισμούς σιδήρου ενώ, παράλληλα, καταστρέφει τη μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων (Tomita et. al., 2002).
4. Ανοσοσφαιρίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα του οργανισμού απέναντι σε βακτήρια και ιούς.

#### **1.10.1 Πλεονεκτήματα-αντιοξειδωτική δράση**

Η αξία του τυρογάλακτος ως πρώτης ύλης για την παραγωγή διατροφικών προϊόντων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή περιεκτικότητά του σε απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία απορροφούνται αποτελεσματικότερα σε σχέση με τα διαλύματα αμινοξέων (Daenzer et. al., 2001). Επίσης, συμβάλλει στην επιδιόρθωση των ιστών (για παράδειγμα σε περίπτωση τραυματισμού) λόγω της σημαντικής περιεκτικότητάς του σε διακλαδισμένα αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) καθώς θεωρείται ότι, κυρίως, η λευκίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης (Anthony et. al., 2001). Η πρωτεΐνη του τυρογάλακτος έχει συνδεθεί, επίσης, με την αύξηση της δύναμης, την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των ιστών (Kerasioti et. al., 2013). Τέλος, είναι γνωστό ότι η υδρόλυσή της οδηγεί στο σχηματισμό βιοδραστικών πεπτιδίων παρουσιάζοντας έτσι σημαντική αντιμικροβιακή, αντιπερτασική και αντιθρομβωτική δράση (Clare and Swaisgood, 2000, Pihlanto Leppala, 2001). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης του τυρογάλακτος, τα πεπίδια που προκύπτουν από την υδρόλυσή της είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (Conway et. al., 2013). Η αντιοξειδωτική δράση του τυρογάλακτος



μετά από υδρόλυση είναι αποτέλεσμα ενός συστήματος λιποσωμικής οξειδωσης που καταλύεται από σίδηρο ή χαλκό (Colbert and Decker, 1991, Pena-Ramos and Xiong, 2001). Επιπλέον, έχει δείχτει ότι μετά από υδρόλυση με μικροβιακές πρωτεάσες (όπως αλκαλάση), η αντιοξειδωτική δράση της αυξάνεται σημαντικά (Adriana et. al., 2010). Τέλος, στο τυρόγαλα περιέχεται σημαντικός αριθμός θειούχων αμινοξέων, όπως η κυστεΐνη, η οποία χρησιμοποιείται για την ενδοκυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης (εικόνα 19), το κυριότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό (Marshall 2004) συμβάλλοντας στην προσαρμογή του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες (Kerasioti et. al., 2012).



Εικόνα 19: Βιοσύνθεση της γλουταθειόνης (Musgrave et. al., 2013).

### 1.11 Στέμφυλα (Grape pomace)

Τα στέμφυλα (εικόνα 20) είναι το κύριο υποπροϊόν της οινοποίησης και αποτελούνται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, δηλαδή τους βοστρύχους (κοτσάνια), τους φλοιούς και τα κουκούτσια (γίγαρτα). Αποτελούν επομένως τη φυτική βιομάζα που προκύπτει μετά από την πίεση των σταφυλιών και την παραλαβή του μούστου. Τα στέμφυλα αποτελούν το κύριο, από άποψη όγκου και εναπομένουσας αξίας, υποπροϊόν της οινοποιίας καθώς αποτελούν περίπου το 17% της μάζας των χρησιμοποιημένων σταφυλιών. Η διαχείριση αυτού του μεγάλου όγκου στερεών αποβλήτων αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τις οινοπαραγωγές μονάδες καθώς η απόρριψή του σε οικοσυστήματα μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμισή τους αλλά και σε οικονομικές απώλειες. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στις ευεργετικές ιδιότητες των στεμφύλων λόγω των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων τους ώστε να καταστούν το βασικό συστατικό ζωοτροφών. Τα στέμφυλα έχουν ευεργετικές ιδιότητες τόσο στην

υγεία των ζώων όσο και των καταναλωτών ενώ, παράλληλα, βοηθούν ώστε οι τιμές των ζωοτροφών να είναι ανταγωνιστικές.



Εικόνα 20: Στέμφυλα.

Έχειδειχτείότισταζώατοοξειδωτικόστρεςσυνδέεταιμεδιάφορεςπαθολογικέςκαταστάσειςόπωςησηψαιμία, ημαστίτιδα, ηεντερίτιδα, ηπνευμονίακαιηαρθρίτιδα (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Μεβάσητα παραπάνω, ταστέμφυλαείναιπολλάυποσχόμενοσυστατικόζωοτροφώνλόγωτωνυψηλώνεπιπέδωνπολυφαινολώνκαιφρουκτοολιγοσχαριτώνπουπεριέχουν (Agte et. al., 2010). Ηπλειοψηφίατωνπολυφαινολικώνενώσεωνπουπεριέχονταισταστέμφυλαεντοπίζονταιστοφλοιόκαιτακουκούτσιακαιανήκουνσεδυοκατηγορίεςενώσεων. Ηπρώτηκατηγορίαείναιταφλαβονοειδή(μεκύριεςκατηγορίεςτιςανθοκυανιδίνες, τιςφλαβονόλες, τιςφλαβόνεςκαιτιςχαλκόνες)καιηδεύτερηείναιοιμηφλαβονοειδείςενώσεις(μεκύριουςεκπροσώπουςταφαινολικάοξέα, τασιλβένια, τιςτανίνεςκαιτιςκουμαρίνες) (Xu et. el., 2016). Διάφορες *in vitro* και *in vivo* μελέτεςέχουνδείξειότιηδιατροφήπουείναιπλούσιασεστέμφυλαοδηγείσεαυξημένηαντιοξειδωτικήικανότητακαιενισχυμένηεντερικήμικροχλωρίδα (Kafantaris et. al., 2017). Επιπλέον, οιπολυφαινόλεςπουπεριέχονταισταστέμφυλα

μειώνουν την τοξικότητα που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν την οξειδωτική καταστροφή των βιολογικών μακρομορίων. Ακόμη, συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα του οργανισμού μέσω της αύξησης των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων, όπως η γλουταθειόνη και η καταλάση ενώ, ταυτόχρονα, ενισχύουν σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα (Alonso et. al., 2002). Τέλος, διαπιστώνεται ότι η εισαγωγή των στεμφύλων στις ζωοτροφές οδηγεί σε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, σε περιορισμό της ανάπτυξης παθογόνων, σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και σε βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου κρέατος λόγω της βελτιωμένης τους σύνθεσης σε λιπαρά οξέα (Kafantaris et. al., 2018).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος και τα στέμφυλα αποτελούν παραπροϊόντα της τυροκομίας και της οινοποιίας, αντίστοιχα και για το λόγο αυτό είναι σημαντικοί ρύποι για τα οικοσυστήματα, στα οποία απορρίπτονται. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αξιοποίηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος και των στέμφυλων στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων και ζωοτροφών. Έτσι, με βάση το παραπάνω σκεπτικό, δημιουργήθηκαν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με πρωτεΐνη τυρογάλακτος και στέμφυλα και χορηγήθηκαν σε χοιρίδια. Σκοπός του πειράματος ήταν η εκτίμηση της επίδρασης των ζωοτροφών αυτών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση στον τετρακέφαλο μυ και το ήπαρ.

## **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος**

Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος αποκτήθηκε από την εταιρία Hellenic Protein S.A. Το διατροφικό της περιεχόμενο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Διατροφικό περιεχόμενο της πρωτεΐνης τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Διατροφικό περιεχόμενο (ανά 100 g)	
Ενέργεια	396 kcal/1678kj
Πρωτεΐνη	80 g
Υδατάνθρακες	10 g
Λίπη	4 g
Νάτριο	157 mg
Κάλιο	397 mg
Ασβέστιο	415 mg
Φώσφορος	319 mg
Μαγνήσιο	73 mg

### 3.2 Στέμφυλα

Τα στέμφυλα προέρχονταν από κόκκινα σταφύλια (*Vitis vinifera*, μοσχάτο), και ελήφθησαν από οινοποιείο του Τυρνάβου Λάρισας. Προστέθηκαν στις ζωοτροφές ως ενσίρωμα, το οποίο περιείχε επιπλέον καλαμπόκι, νερό και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Η σύσταση του πειραματικού ενσιρώματος φαίνεται στον πίνακα 2. Με βάση προηγούμενη μελέτη, η αναλογία των συστατικών ήταν τέτοια που το τελικό ενσίρωμα περιείχε 60% στερεά και 40% υγρά συστατικά (Gerasopoulos et. al., 2015a). Η διαφορά μεταξύ του ενσιρώματος ελέγχου και πειραματικού ήταν ότι τα στερεά συστατικά στο τελευταίο περιείχαν 9% στερεά στέμφυλα.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση ενσιρώματος στέμφυλων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Συστατικά	g/kg
Στερεά συστατικά	600
CP	87.00
Ακατέργαστο λίπος	42.00
Στάχτη	16.00
Ακατέργαστες ίνες	26.00
Μεταβολίσιμη ενέργεια (Mj/kg DM) <sup>2</sup>	17.15

Για τη γαλακτική ζύμωση του καλαμποκιού και την παρασκευή του ενσίρωματος καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια γαλακτικού οξέος με βάση τη σύσταση που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο (11CFT, Pioneer, Buxtehude, Germany). Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος διαλύθηκαν σε νερό (10%) με ανάδευση και θέρμανση στους 40°C ώστε να ενεργοποιηθούν. Ακολούθως, τα βακτήρια αναμείχθηκαν με καλαμπόκι (1 g βακτηρίων για κάθε 100 kg καλαμποκιού). Το ενσίρωμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε σάκους κενού και λίγο πριν τη χορήγηση αναμείχθηκε με άλλα συστατικά για την προετοιμασία της τελικής τροφής των χοιριδίων.

### 3.3 Ζώα

Συνολικά, για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 24 χοιρίδια της φυλής Landrace x Large White - Duroc – Pietrain από το χοιροστάσιο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλίας στη Λάρισα. Τα χοιρίδια στεγάστηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες (12ωρος φωτός/σκότους, θερμοκρασία 27-33°C, υγρασία 50-70%) και ομαδοποιήθηκαν σε στάνες (μία στάνη για κάθε πειραματική ομάδα).

### 3.4 Πειραματική διαδικασία

Όλα τα νεογέννητα χοιρίδια τρέφονταν αποκλειστικά με μητρικό γάλα για 20 ημέρες. Στη συνέχεια, τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες (12 χοιρίδια ανά ομάδα). Για το πείραμα χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος, οι ομάδες είχαν ως εξής: i) ομάδα ελέγχου, που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με κανονική τροφή ii) πειραματική ομάδα (WPC), που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με τροφή πλούσια σε συμπύκνωμα αιγοπρόβειας πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Για το πείραμα χορήγησης στέμφυλων, οι ομάδες είχαν ως εξής: i) ομάδα ελέγχου, που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με κανονική τροφή ii) πειραματική ομάδα (GP), που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με τροφή πλούσια σε στέμφυλα. Το παραπάνω πρότυπο διατροφής ακολουθήθηκε έως την 35<sup>η</sup> ημέρα (για 15 ημέρες) μετά τη γέννηση των χοιριδίων. Κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα χοιρίδια χωρίζονταν από τις μητέρες τους για 8 ώρες την ημέρα και είχαν *ad libitum* πρόσβαση στην τροφή τους, ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα χωρίζονταν από τις μητέρες τους για 10 ώρες την ημέρα. Οι μητέρες τρέφονταν μόνο με κανονική τροφή. Μετά το πέρας των 35 ημερών τα μισά χοιρίδια (n=18 ζώα) από κάθε ομάδα (n=6 ζώα για την ομάδα ελέγχου και 6 ζώα για την κάθε

πειραματική ομάδα στις 35 ημέρες) θανατώθηκαν και έγινε η λήψη των δειγμάτων για την πρώτη χρονική στιγμή του πειράματος. Τα εναπομείναντα χοιρίδια (n=18 ζώα) τρέφονταν μόνο με την κανονική τροφή για επιπλέον 15 ημέρες. Μετά το πέρας των 50 ημερών, τα χοιρίδια (n=6 ζώα για την ομάδα ελέγχου και n=6 ζώα για την κάθε πειραματική ομάδα για τις 50 ημέρες) θανατώθηκαν και έγινε η λήψη των δειγμάτων για τη δεύτερη χρονική στιγμή του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα χοιρίδια ζυγίζονταν εβδομαδιαίως και η πρόσληψη τροφής καταγραφόταν σε καθημερινή βάση. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σε συμφωνία με τις οδηγίες για την ασφάλεια και τη χρήση εργαστηριακών ζώων (National Research Council, 1996).

### **3.5 Συλλογή ιστών**

Ο τετρακέφαλος μυς και το ήπαρ των χοιριδίων συλλέχθηκαν στις 35 και τις 50 ημέρες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πλήρως αυτοματοποιημένες εγκαταστάσεις σφαγείου από ειδικά μηχανήματα και εξειδικευμένο προσωπικό. Οι ιστοί απομακρύνθηκαν άμεσα και καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνουν οι μετρήσεις.

### **3.6 Ομογενοποίηση των ιστών**

Για την ομογενοποίηση, 500 mg ιστού διαλύθηκαν σε 1.000  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH=7,4) το οποίο περιείχε 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl και 1 mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με ειδικό ομογενοποιητή και στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία με υπερήχους ώστε να απελευθερωθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα πρωτεΐνης. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) και το υπερκείμενο (το ομογενοποίημα του ιστού) συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή του.

### **3.7 Πρωτόκολλα βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που μετρήθηκαν**

Στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν η δραστηριότητα της περοξειρεδοξίνης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η συγκέντρωση του NADPH και η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων.

### 3.7.1 Προσδιορισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

#### *Αρχή της Μεθόδου*

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης διαλυμάτων αλβουμίνης γνωστών συγκεντρώσεων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford. 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 απορροφά στα 595 nm (Bradford 1976).

#### *Πειραματική διαδικασία*

Αραιώνουμε το προς μέτρηση δείγμα 1/20 και προσθέτουμε το αντιδραστήριο Bradford και το δείγμα σε σωληνάρια erpendorf σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	<b>Τυφλό</b>	<b>Δείγμα</b>
H <sub>2</sub> O	20 μl	-
Δείγμα	-	20 μl
Αντιδραστήριο Bradford	1000 μl	1000 μl

Ακολουθεί ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έγχυση των περιεχομένων σε πλαστική κυβελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προκύπτει από την καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

#### *Καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση*

Φτιάχνουμε ένα διάλυμα αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA) υψηλής συγκέντρωσης (stock) (10 mg/ml). Αραιώνουμε το διάλυμα αυτό διαδοχικά ώστε να φτιάξουμε διαλύματα αλβουμίνης με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 και 1,4 mg/ml ως ακολούθως:

0,05 mg/ml (1): Αραίωση 1/200 (5 μl stock + 995 μl H<sub>2</sub>O)

0,1 mg/ml (2): Αραίωση 1/100 (10 μl stock + 990 μl H<sub>2</sub>O)

0,2 mg/ml (3): Αραίωση 1/50 (20 μl stock + 980 μl H<sub>2</sub>O)

0,4 mg/ml (4): Αραίωση 1/25 (40 μl stock + 960 μl H<sub>2</sub>O)

0,8 mg/ml (5): Αραίωση 1/12,5 (80  $\mu$ l stock + 920  $\mu$ l H<sub>2</sub>O)

1 mg/ml (6): Αραίωση 1/10 (100  $\mu$ l stock + 900 $\mu$ l H<sub>2</sub>O)

1,4 mg/ml (7): Αραίωση 1/7 (140  $\mu$ l stock + 860  $\mu$ l H<sub>2</sub>O)

Προσθέτουμε σε σωληνάρια eppendorf τις παρακάτω ποσότητες:

	Τυφλό	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Απιονισμένο νερό	20 $\mu$ l	-	-	-	-	-	-	-
Διάλυμα αλβουμίνης	-	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Ακολουθεί ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έγχυση των περιεχομένων σε πλαστική κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Με το τυφλό μηδενίζουμε. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη.

### 3.7.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

*Αρχή της μεθόδου*

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPx βασίζεται στην οξείδωση του NADPH (Flohe and Gunzler 1984, Veskoukis et. al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, η GSSG παράγεται κατά την αναγωγή ενός οργανικού υδροϋπεροξειδίου από την GPx και μειώνεται άμεσα και συνεχώς από την αναγωγή της γλουταθειόνης. Η συνακόλουθη οξείδωση του NADPH σε NADP<sup>+</sup>, παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.

*Αντιδραστήρια*

Ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer) 100 mM (pH=7)

MW (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 g/mol

MW (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 174 g/mol

Για να φτιάξουμε 500 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιούμε 250 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 250 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.



Για το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ζυγίζουμε 6,8 g και το διαλύουμε σε 250 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Για το  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ζυγίζουμε 8,7 g και το διαλύουμε σε 250 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε 186 mg EDTA συγκέντρωσης 1 mM. Ρυθμίζουμε το pH στο 7.

Ανηγμένη γλουταθειόνη ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ ) MW : 307,3 g/mol

Κατά την ημέρα του πειράματος παρασκευάζουμε διάλυμα το οποίο περιέχει 31 mg GSH σε 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

NADPH (φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοσίδιο,  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$ )  
MW:744,41 g/mol

Κατά την ημέρα του πειράματος παρασκευάζουμε διάλυμα 1,5 mM NADPH σε 0,1%  $\text{NaHCO}_3$  διαλύοντας 11,2 mg NADPH και 10 mg  $\text{NaHCO}_3$  σε 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Για να παρασκευάσουμε διάλυμα 2,4 U/ml GR, αραιώνουμε 10μl από το εμπορικά διαθέσιμο stock (500 U, 5 mg/ml, 120 U/mg protein), σε 4990 μl ρυθμιστικού διαλύματος.

Υδροϋπεροξειδίο (tert- Butyl hydroperoxide t-BuOOH)

Για να παρασκευάσουμε διάλυμα BuOOH συγκέντρωσης 12 mM αραιώνουμε 5 μl του tBuOOH (συγκέντρωση 6M) σε 2495 μl  $\text{H}_2\text{O}$ .

Πειραματική διαδικασία

Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf των 1,5 ml τα παρακάτω:

500 μl ρυθμιστικού διαλύματος,

100 μl ομογενοποιημένου ιστού,

100 μl GR και

100 μl GSH.

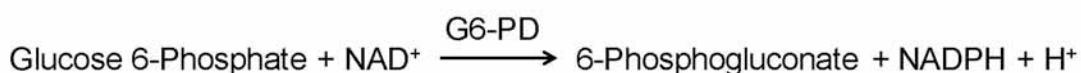
Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τοποθετούμε το μίγμα σε κυψελίδα και προσθέτουμε 100 μl του διαλύματος NADPH και επωάζουμε για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε στην κυψελίδα 100 μl *t*-BuOOH, την ανακινούμε καλύπτοντας με

παραφίλμ και καταγράφουμε τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm για 5 λεπτά (Flohé et. al., 1984). Η δραστικότητα της GPx υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του NADPH.

### 3.7.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του NADPH

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέτρηση βασίστηκε σε πρωτόκολλα που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν (Wagner and Scott 1994, Veskoukis et. al., 2018). Τόσο το NADPH όσο και το NADP<sup>+</sup> εξάγονται από τα δείγματα και ακολούθως το NADP<sup>+</sup> καταστρέφεται μετά από θέρμανση στους 60°C. Έτσι, στα δείγματα παραμένει μόνο η ανηγμένη μορφή του NADP<sup>+</sup>, δηλαδή το NADPH. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6 φωσφογλυκονικό οξύ μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης με ταυτόχρονη αναγωγή του NADP<sup>+</sup> σε NADPH. Η παραπάνω αντίδραση περιγράφεται παρακάτω:



Η μετατροπή αυτή παρατηρείται στα 570 nm όπου το προϊόν της αναγωγής του MTT (χρωστική τετραζολίου) παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση.

#### *Αντιδραστήρια*

Extraction buffer που περιέχει 20 mM νικοτιναμίδιο, 20 mM διττανθρακικό νάτριο και 100 mM ανθρακικό νάτριο

Για να παρασκευάσουμε 100 ml του extraction buffer ζυγίζουμε και διαλύουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια σε 100 ml dH<sub>2</sub>O:

244 mg νικοτιναμιδίου (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O, MW: 122,12 g/mol),

168 mg διττανθρακικού νατρίου (NaHCO<sub>3</sub>, MW: 84 g/mol),

1,06 g ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MW: 106 g/mol).

Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (NADP) cycling buffer που περιέχει 100 mM Tris-HCl pH 9, 0,5 mM MTT, 2 mM PES, 5mM EDTA και 1,3 U/ml αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD).

Για να παρασκευάσουμε 10 ml NADP cycling buffer ζυγίζουμε και διαλύουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια σε 10 ml dH<sub>2</sub>O:

124,6 mg Tris-HCl (MW: 124,6 g/mol),

2,07 mg MTT (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S, MW: 414,32 g/mol),

6,7 mg PES (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW: 334,4 g/mol),

14,6 mg EDTA ((HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>, MW: 292,2 g/mol),

78 μl αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης (ώστε να αντιστοιχεί σε 13 U/ml) (G6PD, stock solution 250 U).

#### 6 φωσφορική γλυκόζη 10 mM

Για να παρασκευάσουμε 2 ml του διαλύματος, ζυγίζουμε και διαλύουμε 5,6 mg G6P (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>9</sub>P, MW: 282.1).

#### *Πειραματική διαδικασία*

Απομόνωση οξειδωμένης και ανηγμένης πυριδίνης (NADP) από τον ιστό:

Προσθέτουμε 50 μl ιστού σε 450 μl του extraction buffer που διατηρείται στους 4°C σε ένα φιαλίδιο erpendorf και ανακατεύουμε με την πιπέτα.

Τοποθετούμε αμέσως τα φιαλίδια σε πάγο και τα αφήνουμε στο ψυγείο για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα επαναφέρουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυγοκεντρούμε τα erpendorf (16.000 g, 1 λεπτό, 4°C), συλλέγουμε το υπερκείμενο και το διατηρούμε στον πάγο και στο σκοτάδι.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του NADPH:

Τοποθετούμε από 100 μl του παραπάνω διαλύματος σε 3 νέα φιαλίδια erpendorf και τα επωάζουμε για 30 λεπτά στους 60°C σε υδατόλουτρο. Η θέρμανση καταστρέφει τις οξειδωμένες μορφές των πυριδινών χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τις ανηγμένες μορφές. Μετά από την επώαση των 30 λεπτών τοποθετούμε τα φιαλίδια στον πάγο για 5 λεπτά.

Στα 100 μl του ομογενοποιημένου ιστού προσθέτουμε 800 μl παγωμένου NADP cycling buffer (παρασκευάζεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος). Προχωρούμε με ένα δείγμα κάθε φορά.

Μεταφέρουμε 850 μl του μείγματος σε πλαστική κυψελίδα, προσθέτουμε 100 μl 6 φωσφορικής γλυκόζης (10 mM), αναδεύουμε την κυψελίδα και καταγράφουμε τη

διαφορά στην απορρόφηση στα 570 nm για 2 λεπτά. Η συγκέντρωση του NADPH υπολογίζεται με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του NADPH.

#### *Σημαντικές παρατηρήσεις*

Ο ιστός και το cycling buffer δεν θα πρέπει να παραμείνουν αναμειγμένα για περισσότερο από 15 λεπτά.

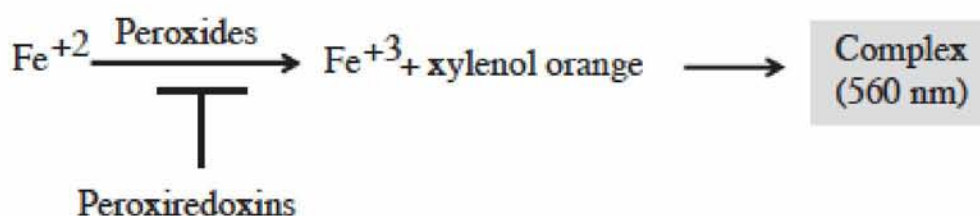
Ο ιστός και το extraction buffer δεν θα πρέπει να παραμένουν αναμειγμένα για περισσότερο από 1 ώρα λόγω της σημαντικής και προοδευτικής αποδόμησης του NADPH.

Καλύπτουμε τα buffer και τα φιαλίδια erpendorf με αλουμινόχαρτο και τα διατηρούμε στους 4°C.

### **3.7.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειρεδοξίνης**

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέτρηση έγινε με βάση πρωτόκολλα που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν (Nelson and Parsonage 2011, Veskoukis et. al., 2018). Η μέθοδος βασίζεται στη μείωση της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων παρουσία δισθενούς σιδήρου και της χρωστικής xylenol orange [ocresolsulfonphthalein- 3,3 bis (methyliminodiacetic acid sodium salt)]. Υπό όξινες συνθήκες, τα υπεροξείδια οξειδώνουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, ο οποίος με τη σειρά του σχηματίζει σύμπλοκο με τη χρωστική. Το σύμπλοκο αυτό αποκτά μπλε-μωβ χρώμα και η μέγιστη απορρόφηση του παρατηρείται στα 560 nm. Η αρχή της μεθόδου φαίνεται παρακάτω:



#### *Αντιδραστήρια*

Δίθειοθρεϊτόλη (DTT, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, MW: 154.25 g/mol)

Για να παρασκευάσουμε 100 ml DTT 0,167mM διαλύουμε 2,576 mg DTT σε 100 ml dH<sub>2</sub>O.

#### Υδροϋπεροξειδίο (t-BOOH, MW: 90.12 g/mol)

Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση 1:1000.

Από το αραιωμένο διάλυμα παίρνουμε 649 μl και τα προσθέτουμε σε H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10 ml.

#### Αντιδραστήριο FOX

Για να παρασκευάσουμε 10 ml αντιδραστηρίου FOX αναμειγνύουμε 100 ml αντιδραστηρίου A και 9,9 ml αντιδραστηρίου B.

Το αντιδραστήριο A περιέχει 25 mM θειικό σίδηρο και 2,5 M θειικό οξύ. Ο θειικός σίδηρος θα πρέπει να διαλυθεί αμέσως στο οξύ επειδή τα ιόντα του σιδήρου αυτοοξειδώνονται εύκολα σε φυσιολογικό pH.

#### Θειικός σίδηρος Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, MW: 392.13 g/mol

Για να παρασκευάσουμε 1 ml 25 mM θειικού σιδήρου διαλύουμε 7 mg σε 1ml θειικού οξέος.

#### Θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW: 98.079 g/mol)

Για να παρασκευάσουμε 100 ml 2,5M θειικού οξέος διαλύουμε 13,9 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-98% σε 86,1 ml H<sub>2</sub>O.

Το αντιδραστήριο B περιέχει 100 mM σορβιτόλη και 125 μM xylenol orange.

#### Σορβιτόλη (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, MW: 182,17 g/mol)

Για να παρασκευάσουμε 50 ml 101 mM σορβιτόλης διαλύουμε 920 mg σορβιτόλης σε 50 ml dH<sub>2</sub>O.

#### Xylenol orange (C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>S, MW: 760.59 g/mol)

Για να παρασκευάσουμε 50 ml 0,126 mM xylenol orange διαλύουμε 4,8 mg στα ίδια 50 ml dH<sub>2</sub>O από το dH<sub>2</sub>O που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως.

### Πειραματική διαδικασία

Για κάθε δείγμα ετοιμάζουμε 4 φιαλίδια erpendorf και ξεχωριστά ετοιμάζουμε 3 επιπλέον φιαλίδια erpendorf για το τυφλό, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Θετικός έλεγχος	Δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	-	20μl
H <sub>2</sub> O	20μl	-
Διθειοθρεϊτόλη (DDT) 100 μM	60μl	60μl
100 μM υπεροξειδίο	20 μl	20μl

Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στον κλίβανο για 30 λεπτά. Από κάθε ένα από τα 3 πρώτα φιαλίδια μεταφέρουμε 50 μl του μείγματος σε νέα και προσθέτουμε 950 μl του αντιδραστηρίου FOX. Από το τέταρτο φιαλίδιο μεταφέρουμε 50 μl σε ένα καινούριο και ακολούθως προσθέτουμε 950 μl dH<sub>2</sub>O. Αυτό το τελευταίο φιαλίδιο είναι το τυφλό του κάθε δείγματος. Αναδεύουμε και επωάζουμε εκ νέου στον κλίβανο για 30 λεπτά. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm. Η δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης υπολογίζεται με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του μίγματος του τρισθενούς σιδήρου με τη χρωστική xylenol orange.

### 3.8 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση × χρόνος) (ANOVA). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0.05$ . Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω Bonferroni *t*-test ( $P < 0.25$ ). Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ± SD.

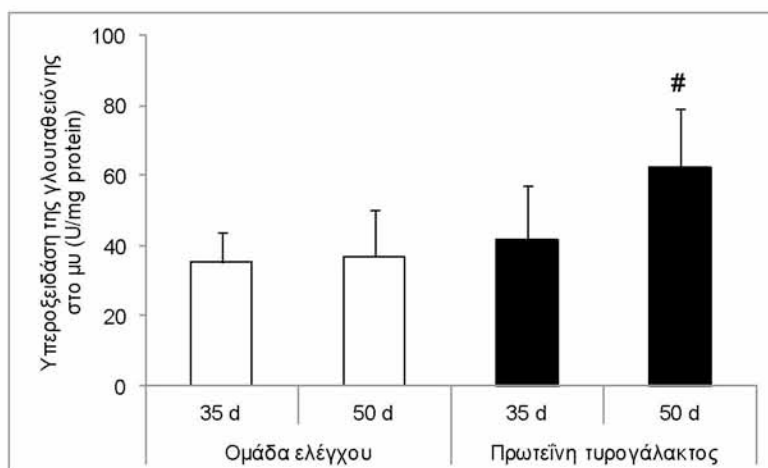
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος

#### 4.1.A. Τετρακέφαλος μυς

##### 1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

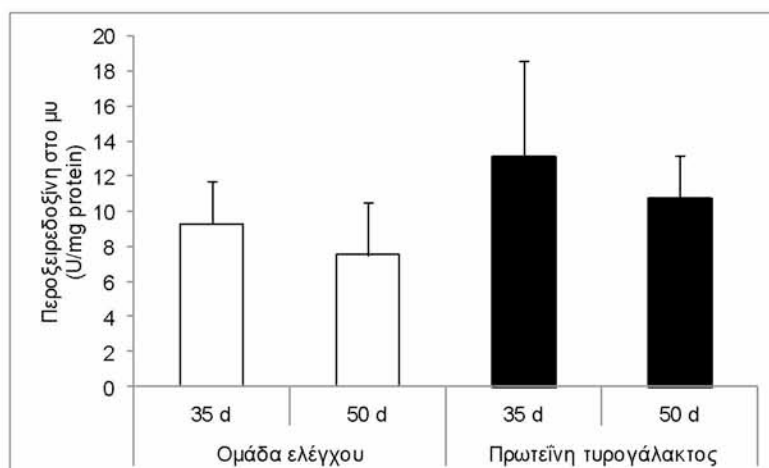
Βρέθηκε κύρια επίδραση της μεταχείρισης. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αύξησε τη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.



Σχήμα 1. Η επίδραση της χορήγησης τροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του τετρακέφαλου μύος. #: Σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 35 ημέρες.

## 2. Περοξειρεδοξίνη

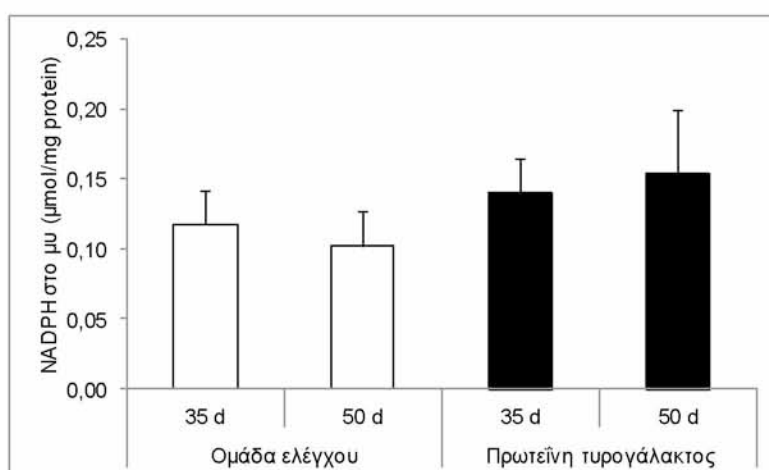
Βρέθηκε κύρια επίδραση της μεταχείρισης. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος οδήγησε σε τάση αύξησης της δραστικότητας της περοξειρεδοξίνης τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 2. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης του τετρακέφαλου μύος.

## 3. NADPH

Βρέθηκε κύρια επίδραση της μεταχείρισης. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αύξησε τη συγκέντρωση του NADPH.



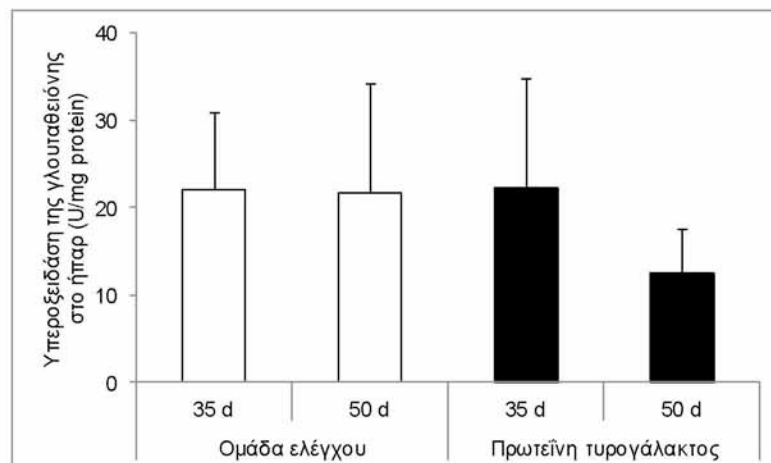
Σχήμα 3. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη συγκέντρωση του NADPH του τετρακέφαλου μύος.



#### 4.1.B. Ήπαρ

##### 1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

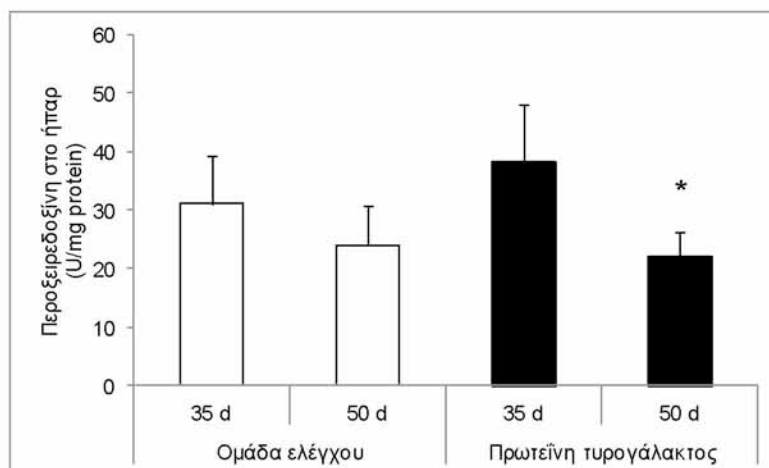
Δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφάνισε τάση μείωσης της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στις 50 ημέρες.



Σχήμα 4. Η επίδραση της χορήγησης τροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του ήπατος.

##### 2. Περοξειρεδοξίνη

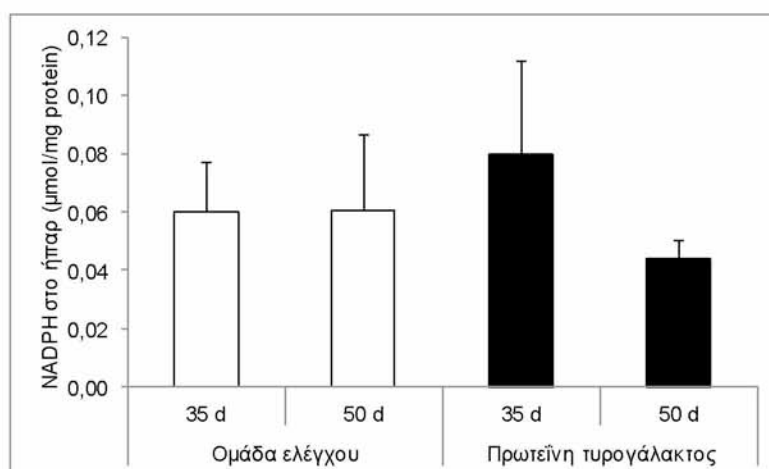
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος οδήγησε σε τάση αύξησης της δραστικότητας της περοξειρεδοξίνης στις 35 ημέρες και τη μείωσε στις 50 ημέρες. Παρατηρήθηκε παρόμοια δράση με το μυ.



Σχήμα 5. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης του ήπατος. \*: Σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στις 35 ημέρες.

### 3. NADPH

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφάνισε τάση μείωσης της συγκέντρωσης του NADPH στις 50 ημέρες.



Σχήμα 6. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στη συγκέντρωση του NADPH του ήπατος.

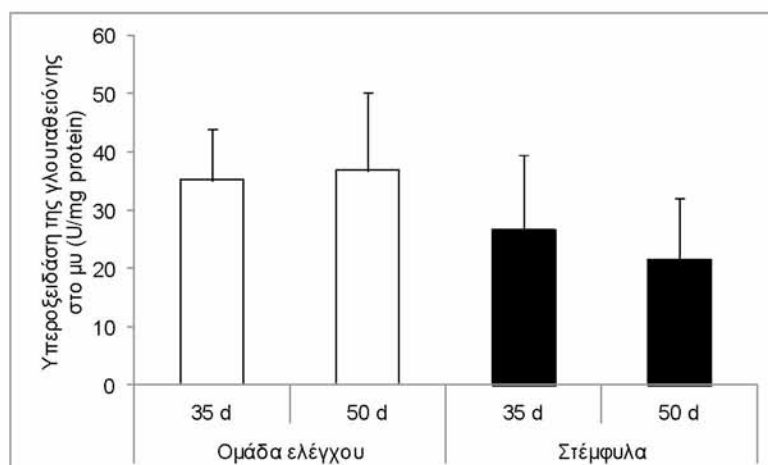
Συνολικά, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτίωσε το αναγωγικό προφίλ του μυός καθώς αύξησε την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και το NADPH, ειδικά στις 50 ημέρες. Η πτώση της περοξειρεδοξίνης στο ίδιο διάστημα καταδεικνύει ότι, πιθανώς, το ένζυμο αυτό ανήκει στη δεύτερη γραμμή άμυνας και, λόγω της βελτίωσης της αντιοξειδωτικής ισχύος που προσέδωσε η πρωτεΐνη τυρογάλακτος στο μυ, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησής της. Στο ήπαρ, και οι τρεις δείκτες βρέθηκαν μειωμένοι στις 50 ημέρες υποδεικνύοντας ότι ο ιστός έχει υποστεί προσαρμογές, μετά από τις τάσεις αύξησης της περοξειρεδοξίνης και του NADPH στις 35 ημέρες. Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών.

## 4.2 Στέμφυλα

### 4.2.A. Τετρακέφαλος μυς

#### 1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

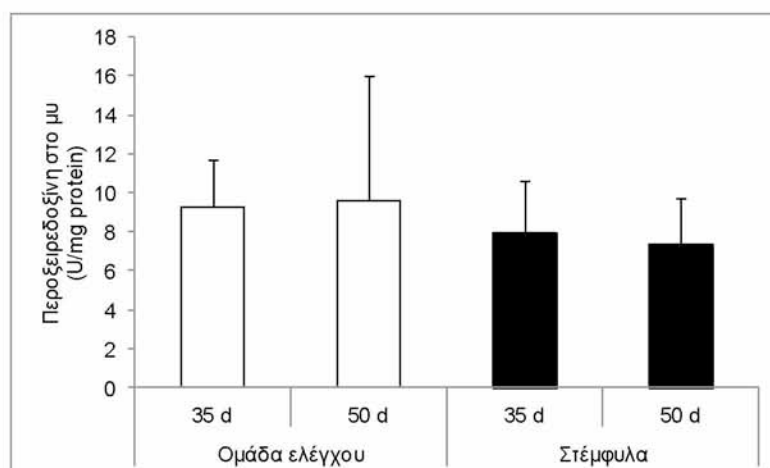
Βρέθηκε κύρια επίδραση της μεταχείρισης. Τα στέμφυλα μείωσαν τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.



Σχήμα 7. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του τετρακέφαλου μύος.

#### 2. Περοξειρεδοξίνη

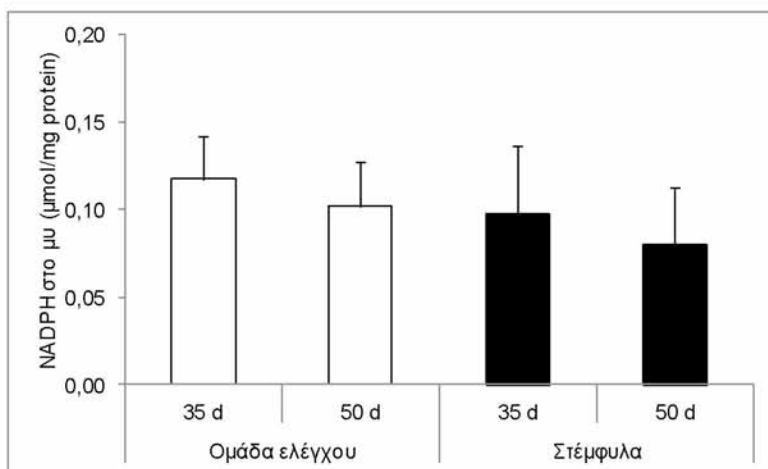
Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση. Τα στέμφυλα εμφάνισαν τάση μείωσης της δραστικότητας της περοξειρεδοξίνης.



Σχήμα 8. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης του τετρακέφαλου μύος.

### 3. NADPH

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση. Τα στέμφυλα εμφάνισαν τάση μείωσης της συγκέντρωσης τους NADPH.

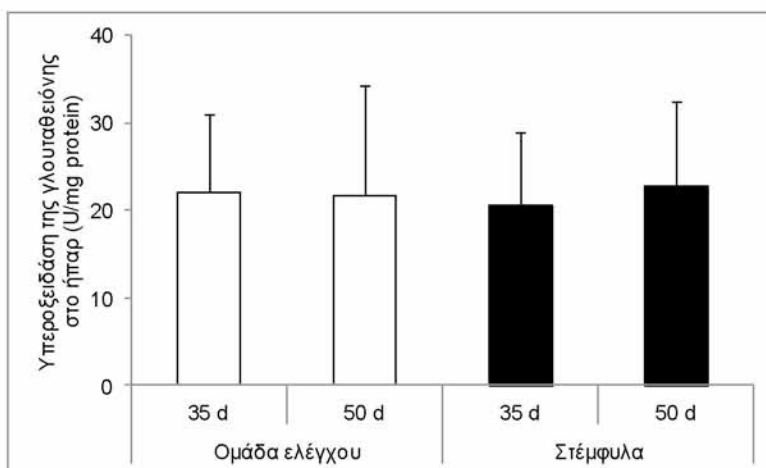


Σχήμα 9. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη συγκέντρωση του NADPH του τετρακέφαλου μυός.

### **4.2.B. Ήπαρ**

#### 1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

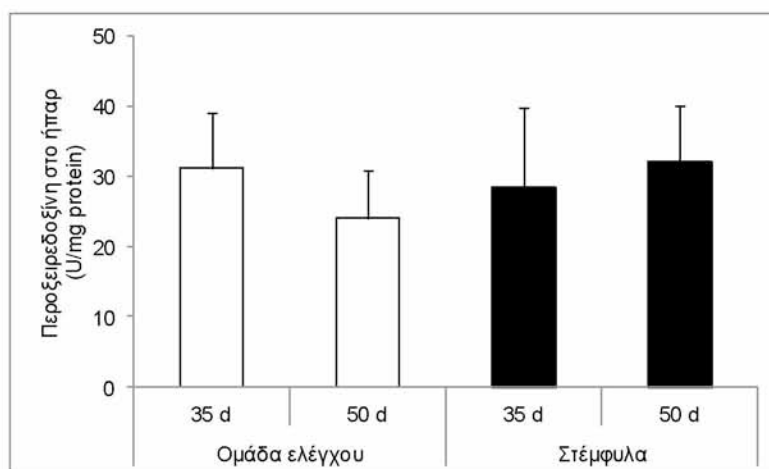
Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση.



Σχήμα 10. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του ήπατος.

## 2. Περοξειρεδοξίνη

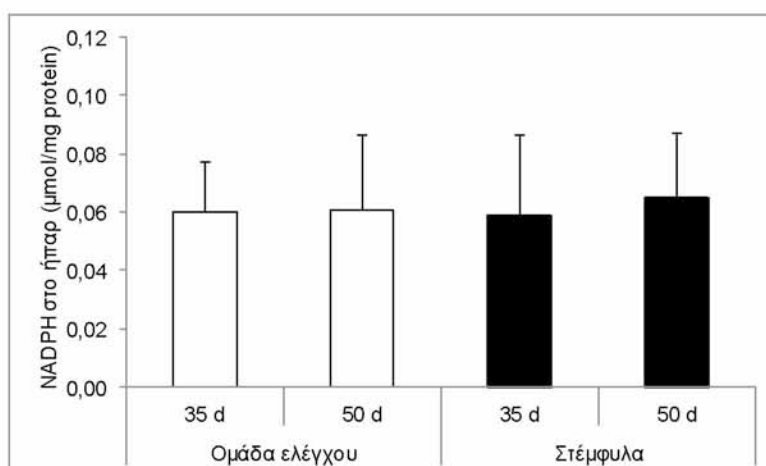
Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση.



Σχήμα 11. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη δραστηριότητα της περοξειρεδοξίνης του ήπατος.

## 3. NADPH

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση.



Σχήμα 12. Η επίδραση της χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα στη συγκέντρωση του NADPH του ήπατος.

Συνολικά, στο μυ και οι τρεις δείκτες βρέθηκαν μειωμένοι στις 50 ημέρες υποδεικνύοντας ότι ο ιστός έχει υποστεί προσαρμογές. Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών. Στο ήπαρ δε βρέθηκαν επιδράσεις. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος φαίνεται ότι έχει πιο ισχυρή αναγωγική δράση σε σύγκριση με τα στέμφυλα.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η οξειδοαναγωγική κατάσταση νεαρών χοιριδίων κρεατοπαραγωγής, τα οποία τράφηκαν με ζωοτροφές εμπλουτισμένες με πρωτεΐνη τυρογάλακτος και στέμφυλα. Για το πείραμα χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με κανονική τροφή και μία πειραματική ομάδα (WPC), που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με τροφή εμπλουτισμένη με αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Για το πείραμα χορήγησης στέμφυλων χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με κανονική τροφή και μία πειραματική ομάδα (GP), που αποτελούνταν από χοιρίδια που τρέφονταν με τροφή εμπλουτισμένη με στέμφυλα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 24 χοιρίδια, στα οποία πραγματοποιήθηκε λήψη του τετρακέφαλου μυός και του ήπατος σε 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη γέννησή τους (35 και 50 ημέρες). Ακολούθως, μετρήθηκαν βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συγκεκριμένα η δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και η συγκέντρωση του NADPH.

Όσον αφορά το πείραμα χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος, η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και η συγκέντρωση του NADPH βρέθηκαν αυξημένες στον τετρακέφαλο μυ ενώ η δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης μειώθηκε στο ίδιο διάστημα. Στο ήπαρ, οι τρεις δείκτες εμφάνισαν τάσεις αύξησης στις 35 ημέρες, ωστόσο βρέθηκαν μειωμένοι στις 50 ημέρες. Συνολικά, από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος βελτίωσε το αναγωγικό προφίλ του μυός. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη τυρογάλακτος βελτιώνει σημαντικά το αναγωγικό προφίλ αρουραίων μετά από μέτρηση δεικτών σε διάφορους ιστούς (Kerasioti et al., 2018). Ωστόσο η δραστικότητα της περοξειρεδοξίνης, μειώθηκε στις 50 ημέρες. Αυτή η μείωση καταδεικνύει ότι, πιθανώς, το ένζυμο αυτό ανήκει στη δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού και καθώς η πρωτεΐνη τυρογάλακτος οδήγησε σε αύξηση της αντιοξειδωτικής ισχύος στο μυ, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησής της. Επίσης, η διαφορετική οξειδοαναγωγική κατάσταση που παρατηρήθηκε κατά την μέτρηση των δεικτών στις 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας, συνέχεια της οποίας



αποτελεί η παρούσα πτυχιακή εργασία, έδειξε ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε στις 35 ημέρες χορήγησης ζωοτροφής εμπλουτισμένης με πρωτεΐνη τυρογάλακτος στο πάγκρεας (29,33%), ωστόσο μειώθηκε στον εγκέφαλο (15,96%) (Kafantaris et. al., αδημοσίευτα δεδομένα). Στις 50 ημέρες έδειξαν ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε σημαντικά στο πάγκρεας (60%) και στους νεφρούς (23%). Αντιθέτως, στην καρδιά, τον εγκέφαλο και τον σπλήνα παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή της κατά 20%, 14% και 16%, αντίστοιχα.

Επίσης, στις 50 ημέρες χορήγησης τα επίπεδα της GSH βρέθηκαν αυξημένα στο ήπαρ (138%), την καρδιά (23%), τους νεφρούς (72%) και το πάγκρεας (169%), μειώθηκαν ωστόσο στον σπλήνα (38%) και το στομάχο (422%). Η μείωση που εμφάνισαν και οι 3 δείκτες στις 50 ημέρες στο ήπαρ καταδεικνύει ότι, πιθανώς, ο ιστός έχει υποστεί προσαρμογές λόγω της τάσης αύξησης της δραστηριότητας της περοξειρεδοξίνης και της συγκέντρωσης του NADPH στις 35 ημέρες. Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών λόγω της αυξημένης αντιοξειδωτικής ισχύος και οικονομίας των κυττάρων.

Όσον αφορά το πείραμα χορήγησης στέμφυλων, και οι 3 δείκτες εμφάνισαν τάση μείωσης στον τετρακέφαλο μυ ειδικά στις 50 ημέρες, ενώ στο ήπαρ δεν βρέθηκαν σημαντικές επιδράσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς οι Kafantaris et. al. 2018 έδειξαν ότι η χορήγηση στέμφυλων σε χοιρίδια είχε αντιοξειδωτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε στις 35 ημέρες στο πάγκρεας (27%) και το στομάχο (22%), μειώθηκε ωστόσο στον εγκέφαλο (31%). Στις 50 ημέρες χορήγησης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε στον τετρακέφαλο μυ (41%), τους νεφρούς (54%), τους πνεύμονες (20%), το πάγκρεας (55%) και το στομάχο (20%), ενώ μειώθηκε στον εγκέφαλο (18%). Επίσης, η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως δείκτη οξείδωσης πρωτεϊνών στις 35 ημέρες μειώθηκε στον εγκέφαλο (31%), το σπλήνα (49%) και το ήπαρ (27%). Σημαντική ήταν η μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και στις 50 ημέρες χορήγησης σε ποσοστό 37% στο ήπαρ, 25% στον τετρακέφαλο μυ, 32% στον εγκέφαλο, 48% στον σπλήνα, 26% στους πνεύμονες, 36% στο στομάχι και 55% στο πάγκρεας. Τέλος, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό (TBARS) ως δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων μειώθηκαν στους περισσότερους ιστούς τόσο στις 35 όσο και στις 50 ημέρες χορήγησης. Η μείωση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της περοξειρεδοξίνης και της συγκέντρωσης του NADPH στο μυ δείχνουν ότι ο ιστός

έχει υποστεί προσαρμογές. Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών. Το ίδιο ισχύει και στο ήπαρ, όπου δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις μετά τη χορήγηση ζωοτροφής εμπλουτισμένης με στέμφυλα.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα εργασία καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι ζωοτροφές που είναι εμπλουτισμένες με πρωτεΐνη τυρογάλακτος και στέμφυλα βελτιώνουν σημαντικά την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών, είτε ενεργοποιώντας κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, είτε συμβάλλοντας στη δημιουργία προσαρμογών. Επομένως, η χρήση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με αντιοξειδωτικές ουσίες θα έχει σημαντικό όφελος τόσο στην ποιότητα του προς κατανάλωση κρέατος όσο και στον περιορισμό της ρύπανσης. Βέβαια, είναι απαραίτητο στο μέλλον να εκπονηθούν και άλλες παρόμοιες μελέτες ώστε να εδραιωθούν οι παραπάνω ευεργετικές ιδιότητες καθώς και να προσδιοριστούν πλήρως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη τυρογάλακτος και τα στέμφυλα ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adriena DK, Anne P, Pertti M, Ladislav C, Hannu JTK . Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur Food Res Technol.* 2010;230:865–874.

Agledal L, Niere M, Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Rep.* 2010;15(1):2-10.

Agte V, Khetmalis N, Nilegaonkar S, Karkamkar S and Yadav S. Prebiotic potential of juice grape varieties and some hybrids. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2010;69, 850–854.

Alonso AM, Guillén DA, Barroso CG, Puertas B, García A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem.* 2002 Oct 9;50(21):5832-6.

Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis inskeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001;131:856S-860S.

Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000 Oct;267(20):6102-9.

Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams CH Jr. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 15;94(8):3621-6.

Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001 Sep;10(4):153-8.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1464-76.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):42-7.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):483-95.

Benhar M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb 2. pii: S0891-5849(18)30038-8.

Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999;65(18-19):1865-74.

Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci*. 2004 Mar;29(3):111-8.

Bhowmick D, Mugesh G. Insights into the catalytic mechanism of synthetic glutathione peroxidase mimetics. *Org Biomol Chem*. 2015 Nov 7;13(41):10262-72.

Bindoli A, Rigobello MP, Deeb DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med*. 1992 Oct;13(4):391-405.

Björnstedt M, Kumar S, Björkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci*. 1997 Sep;10(2-3):271-9.

Brigelius-Flohé R1, Kipp AP. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1259:19-25.

Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res*. 1998 Jun;28(6):601-9.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Oct;8(10):766-75.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527-605.

Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 2000;83:1187–1195.

Colbert LB, Decker EA. Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *J Food Sci.* 1991;56:1248–1250.

Conway V1, Gauthier SF, Pouliot Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2013 Jan 16;61(2):364-72.

Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016 Jun;95:27-42.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001 Mar;53(1):135-59.

Daenzer M, Petzke KJ, Bequette BJ, Metges CC. Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J Nutr* 2001;131:1965-1972.

Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jun 6;305(3):761-70.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997 May 15;324 ( Pt 1):1-18.

Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.* 2001 May;85 Suppl 2:S67-74.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.

Fisher AB. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 1;15(3):831-44.

Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Kokkas S, Kantas D, Goulas P, Kouretas D. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol*. 2015 Dec;86:319-27.

Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954 May 7;119(3097):623-6.

Ghafourifar P, Asbury ML, Joshi SS, Kincaid ED. Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Methods Enzymol*. 2005;396:424-44.

Ghezzi P, Bonetto V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics*. 2003 Jul;3(7):1145-53.

Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jun 15;32(12):1264-75.

Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1990;63:69-172.

Guimaraes AKV, Camarão AP, Filho JAR. Botanical composition of diet selected by cattle in cultivated pastures and consorted with legumes, established with and without burning of secondary vegetation. *Agrarian*. 2010; 2 (6): 125-133.

Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem*. 2003 May;14(5):251-8.



Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press (Oxford and New York), 1989;2<sup>nd</sup> edition.

Halliwell B. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic Res.* 1998 Dec;29(6):469-86.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press (Oxford and New York), 1999;3<sup>rd</sup> edition:936.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.

Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 1989 Aug 25;264(24):13963-6.

Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 21;396(1):120-4.

Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, Gerasopoulos K, Stagos D, Mitsagga C, Giavasis I, Makri S, Petrotos K, Kouretas D. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2017 Oct;101(5):e108-e121.

Kafantaris I, Stagos D, Kotsampasi B, Hatzis A, Kypriotakis A, Gerasopoulos K, Makri S, Goutzourelas N, Mitsagga C, Giavasis I, Petrotos K, Kokkas S, Goulas P, Christodoulou V, Kouretas D. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal.* 2018 Feb;12(2):246-255.

Kafantaris I, Stagos D, Kotsampasi B, Kantas D, Koukoumis V, Moschonas ND, Skaperda ZV, Gerasopoulos K, Makri S, Goutzourelas N, Mitsagga C, Giavasis I, Petrotos K, Kokkas S, Goulas P, Christodoulou V, Kouretas D. Effects of whey

protein concentrate on antioxidant status, microbiota and fatty acid profile of growing piglets (αδημοσίευτα δεδομένα).

Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, Lincke C, Dolman KM, Becker K, Schirmer RH, Gromer S, Roos D. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3560-6.

Kerasiote E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis A.M, Koutedakis Y, Stagos D, Kouretas D, Karathanos V. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol*. 2012 Aug;50(8):2805-10.

Kerasiote E, Stagos D, Jamurtas A, Kiskini A, Koutedakis Y, Goutzourelas N, Pournaras S, Aristidis M, Tsatsakis A.M, Kouretas D. Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate–whey protein cake after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:42-6.

Kerasiote E, Stagos D, Tsatsakis AM, Spandidos DA, Taitzoglou I, Kouretas D. Effects of sheep/goat whey protein dietary supplementation on the redox status of rats. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(4):5774-5781.

Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*. 2011 Nov;32(11):797-805.

Kourtzidis IA, Stoupas AT, Gioris IS, Veskoukis AS, Margaritelis NV, Tsantarliotou M, Taitzoglou I, Vrabas IS, Paschalis V, Kyparos A, Nikolaidis MG. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside decreases exercise performance in rats. *J Int Soc Sports Nutr*. 2016 Aug 2;13:32.

Kumar JK, Tabor S, Richardson CC. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3759-64.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):807-69.

Lerner F, Niere M, Ludwig A, Ziegler M. Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 19;288(1):69-74.

Lin SJ, Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Apr;15(2):241-6.

Liu J, Lou Y, Yokota H, Adams PD, Kim R, Kim SH. Crystal structures of an NAD kinase from *Archaeoglobus fulgidus* in complex with ATP, NAD, or NADP. *J Mol Biol.* 2005 Nov 25;354(2):289-303.

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

Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev.* 2004 Jun;9(2):136-56.

Miranda-Vizuete A, Damdimopoulos AE, Spyrou G. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct 6;1447(1):113-8.

Miranda-Vizuete A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem.* 2001 Aug 24;276(34):31567-74.

Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4360-4.

Musgrave WB, Yi H, Kline D, Cameron JC, Wignes J, Dey S, Pakrasi HB, Jez JM. Probing the origins of glutathione biosynthesis through biochemical analysis of glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase from a model photosynthetic prokaryote. *Biochem J.* 2013 Feb 15;450(1):63-72.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 1999 May-Jun;13(3):295-309.

National Research Council (NRC). *Guide for the Care and Use of Laboratory 552 Animals.* National Academy Press, Washington, DC, USA, 1996.

Nelson KJ, Parsonage D. Measurement of peroxiredoxin activity. *Curr Protoc Toxicol.* 2011 Aug;Chapter 7:Unit7.10.

Nikiforov A, Kulikova V, Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015 Jul 4; 50(4): 284–297.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.

Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 1997 Oct;77(4):901-30.

Parsonage D, Karplus PA, Poole LB. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 17;105(24):8209-14.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010 Sep 15;23(2):75-93.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96.

Pihlanto-Leppala A, Koskinen P, Piilola K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* 2000;67:53-64.

Pihlanto Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Tech.* 2001;11:347–356.

Pollak N, Dölle C, Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem J.* 2007 Mar 1; 402(Pt 2): 205–218.

Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J Dairy Sci.* 2001 Dec;84(12):2577-83.

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life.* 2001 Jul;52(1-2):35-41.

Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In *oxidative stress edu*, London, Academic Press, 1985.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2003 Oct 29;531(1-2):231-51.

Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol* 2002;80:109-112.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov;266(1-2):37-56.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.



Veskoukis AS, Margaritelis NV, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Rep.* 2018 Dec;23(1):47-56.

Veskoukis AS, Paschalis V, Kyparos A, Nikolaidis MG. Administration of exercise-conditioned plasma alters muscle catalase kinetics in rat: An argument for in vivo-like  $K_m$  instead of in vitro-like  $V_{max}$ . *Redox Biol.* 2018 May;15:375-379.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Sep;59(9):1428-59.

Wagner TC, Scott MD. Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes. *Anal Biochem.* 1994 Nov 1;222(2):417-26.

Wendel A. *Enzymatic Basis of Detoxication*, vol 1. Academic Press, New York, 1980:333-353.

Winterbourn CC. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ Health Perspect.* 1985 Dec; 64: 321–330.

Xu Y, Burton S, Kim C, Sismour E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Science & Nutrition.* 2016 Jan;4(1):125–133.