



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ & ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ανοσορυθμιστικό δυναμικό του όξινου ορού γιαούρτης

Μαγδαληνή Ν. Καραβούλια

Επιβλέπων καθηγητής:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ανοσορυθμιστικό δυναμικό του όξινου ορού γιαούρτης

“Immunomodulatory potential of acid whey yogurt”

Μαγδαληνή Ν. Καραβούλια

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Αικατερίνη Μοσχοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γκόλφω Μοάτσου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ανοσορυθμιστικό δυναμικό του όξινου ορού γιαούρτης

ΠΜΣ Ολοκληρωμένη διαχείριση παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γιαούρτι είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ζυμούμενα προϊόντα στην κατηγορία των γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Παράγεται από την ζύμωση και πήξη του γάλακτος με τη χρήση των καλλιεργείων *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Ο όξινος ορός είναι το υγρό που συλλέγεται κατά την παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού. ο όρος γιαουρτιού ή αλλιώς «όξινος ορός» (acid whey), χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές pH (3,7-4,8), το οποίο τον διαφοροποιεί από τον γλυκό ορό (sweet whey), δηλαδή το τυρόγαλα. Ο όξινος ορός που προέρχεται από το γιαούρτι θεωρείται παραπροϊόν και οι χρήσεις του είναι ελάχιστες. Τα βιοενεργά πεπτίδια, τα οποία προέρχονται από την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες με βάση την δράση τους, όπως είναι αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική, οπιοειδής, αντιφλεγμονώδης/ ανοσορυθμιστική και αντιμικροβιακή.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτη ήταν η αξιολόγηση του ανοσορυθμιστικού δυναμικού του όξινου ορού γιαουρτιού, από διαφορετικά είδη ζωικής προέλευσης (αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο), έπειτα από *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης του ανθρώπου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να παραχθούν τα τελικά προϊόντα πέψης ώστε να αξιολογηθεί ο φυσιολογικός τους ρόλος στο λεπτό έντερο.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινη κυτταρική καρκινική σειρά THP-1 μονοκυττάρων, τα οποία διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα (ΜΦ) ύστερα από την έκθεσή τους σε $\text{pH}\alpha\text{bol-12-myristate-13 acetate}$ (PMA). Αρχικά, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης για την απελευθέρωση των βιοενεργών πεπτιδίων με ανοσορυθμιστικές ιδιότητες από τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος. Κατόπιν, τα κύτταρα εκτέθηκαν στο προϊόν πέψης και πραγματοποιήθηκε ενεργοποίησή τους με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ούτως ώστε να διαμορφωθούν οι συνθήκες φλεγμονής. Τέλος, η ανοσορυθμιστική δράση του όξινου ορού γιαουρτιού προσδιορίστηκε από την έκφραση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή απόκριση, μέσω της μεθόδου RT-PCR.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια προφλεγμονώδη δράση σε συνθήκες επαγόμενης φλεγμονής από την δράση των πεπτιδίων του ορού του γάλακτος. Ταυτόχρονα, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι

υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων ως προς τα είδη ζωικής προέλευσης στα γονίδια χημειοκίνη 1- μεθυλοκυκλοπροπένιο (MCP1), Ιντερλευκίνη (IL10), μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα Βήτα (TGFB), μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή μεταγραφής 1 (STAT1), μεταλλοπεπτιδάση μήτρας 9 (MMP9), υποδοχέα 2 (TLR2), υποδοχέα 4 (TLR4), Ιντερλευκίνη 1 Βήτα (IL1B) και Ιντερλευκίνη 8 (IL8).

Επιστημονική περιοχή: Όξινος ορός γιαουρτιού

Λέξεις κλειδιά: Όξινος ορός, ζωική προέλευση, ανοσορυθμιστικές ιδιότητες

Immunomodulatory potential of acid whey yogurt

MSc Integrated management of production of milk and dairy products

Department of Animal Sciences

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of General & Special Animal husbandry

ABSTRACT

Yoghurt is one of the most popular fermented products in the category of dairy products due to its high nutritional value. It is produced by the fermentation and coagulation of milk using *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* cultures. Acid whey is the liquid, which results during the preparation of strained yoghurt. Yoghurt whey also known as “acid whey” is characterized by low pH values (3,7-4,8), which differentiates it from sweet whey from cheeses. The acid whey derived from yoghurt is considered a by-product and its uses are minimal. However, bioactive peptides, which are derived from milk whey proteins exhibit biological actions, such as antihypertensive, antioxidant, opioid, anti-inflammatory/immunomodulatory and antimicrobial.

The aim of the present study was to characterize the immunoregulatory potential of acid whey yoghurt, from different species of animal origin (cow, sheep, goat), after *in vitro* simulation of the human gastrointestinal digestion. This method was used in order to produce the final digestion products and evaluate their physiological role in the small intestine was evaluated.

The study was performed in human THP-1 monocytic cancer cell line, differentiated into macrophages (MF) after exposure to phorbol- 12- myristate -13 acetate (PMA). First, all samples were subjected to *in vitro* simulation of gastrointestinal digestion to release bioactive peptides with immunomodulatory properties of whey proteins. Cells were then exposed to the digests and activated with lipopolysaccharide (LPS) to induce inflammatory conditions. Finally, the immunomodulatory effects of acid whey yoghurt was determined by the expression of a series of genes related to the immune response using the RT- PCR method.

The results showed a pro- inflammatory effect in conditions of inflammation induced by the action of whey peptides. At the same time, it was observed that there are differences in gene expression according to species of animal origin in the genes chemokine 1- methylcyclopropene (MCP1), Interleukin 10 (IL10), transforming growth factor Beta (TGFB), signal transducer

and activator of transcription 1 (STAT1), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), receptor 2 (TLR2), receptor 4 (TLR4), Interleukin 1 Beta (IL1B), Interleukin 8 (IL8).

Scientific area: Acid whey yogurt

Keywords: Acid whey, animal origin, immunoregulatory properties

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΚΑΡΑΒΟΥΛΙΑ δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην «Ολοκληρωμένη διαχείριση παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οποιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο Πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού. Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

ΜΑΓΔΑΛΙΝΗ ΚΑΡΑΒΟΥΛΙΑ

1 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Θεοδώρου Γεώργιου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τις συμβουλές, την καθοδήγηση, τη γνώση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, ώστε να ολοκληρώσω την μελέτη μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα, Νταλάκα Ελένη, για τη σημαντικότερη βοήθεια που μου προσέφερε στις αναλύσεις αυτού του πειράματος, καθώς και για τις συμβουλές της όλον αυτό τον καιρό. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και στον αδερφό μου, για την στήριξή τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	5
ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	11
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	11
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 ΓΙΑΟΥΡΤΙ	13
1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΡΑΓΓΙΣΤΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ	15
1.3 ΟΡΟΣ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ.....	16
1.3.1 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ	17
1.4 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΡΟΥ	18
1.4.1 β- ΛΑΚΤΟΓΛΟΒΟΥΛΙΝΗ (β-Ig).....	19
1.4.2 α- ΛΑΚΤΑΛΒΟΥΜΙΝΗ (α-la).....	19
1.4.3 ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΗ Ή ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΟΡΟΥ (Blood Serum Albumin, BSA).....	20
1.4.4 ΑΝΟΣΟΓΛΟΒΟΥΛΙΝΕΣ Ή ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ (IMMUNOGLOBULINS, IGS).....	20
1.4.5 ΠΡΩΤΕΟΖΕΣ- ΠΕΠΤΟΝΕΣ (PP).....	21
1.4.6 ΛΑΚΤΟΦΕΡΙΝΗ (ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΕΡΙΝΗ)	21
1.5 ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	21
1.5.1 ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	22
1.6 ΛΑΚΤΟΖΗ	25
1.7 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΑΛΑΤΑ	25
1.8 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ.....	26
1.9 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	27
1.9.1 ΕΜΦΥΤΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ	27
1.9.2 ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ- ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	28
1.9.3 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ	28
1.9.4 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ <i>IN VITRO</i> ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ.....	29
1.9.5 ΤΗΡ-1 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	29
1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
2.1. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ <i>IN VITRO</i>	33
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	35
2.2.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΡ-1 ΣΕ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	37
2.2.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS).....	38

2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΟΞΙΝΟ ΟΡΟ	39
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	40
2.4 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA	41
2.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	42
2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION).....	43
2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ	48
2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ LPS ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.3.1: Σύγκριση φυσικοχημικής σύστασης (%) γλυκού και όξινου ορού (Blaschek <i>et al.</i> , 2007).	16
Πίνακας 1.4.1: Πρωτεΐνες ορού του αγελαδινού γάλακτος (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).	18
Πίνακας 1.5.1: Βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος, η προέλευσή τους και η κύρια δράση τους.	23
Πίνακας 1.7.1: Περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος σε κύρια ανόργανα συστατικά (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009).	26
Πίνακας 1.8.1: Οι κυριότερες βιταμίνες που περιέχονται στο γάλα ανά 100g προϊόντος (Tamime and Robinson, 1999).	27
Πίνακας 2.1: Δείγματα όξινου ορού καθώς και η πρωτεϊνοπεριεκτικότητά τους.	31
Πίνακας 2.5.1: Γονίδια και αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.	45
Πίνακας 2.5.2: Συνθήκες και στάδια Real Time PCR.	48

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1: Λυοφιλωμένος όξινος ορός γιαουρτιού.	31
Εικόνα 2.2: Γραφική παράσταση που απεικονίζει το σημείο «threshold».	44
Εικόνα 2.3: Καμπύλη $-\Delta F/\Delta T$ προς T ($^{\circ}C$) F.	47
Εικόνα 2.4: Πήκτωμα αγαρόζης κατά την παρατήρηση σε λαμπτήρα UV και απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης.	49

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<p>Διάγραμμα 3.1: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>IL1B</i> και <i>IL8</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεση τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	51
<p>Διάγραμμα 3.1: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>MCP1</i>, <i>TNFRSF1A</i>, <i>TNFA</i> και <i>IL6</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεση τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	52
<p>Διάγραμμα 3.3: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>IL10</i> και <i>TGFB</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	53
<p>Διάγραμμα 3.4: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>ICAM</i>, <i>LST1</i>, <i>TLR2</i>, <i>TLR4</i>, <i>STAT1</i> και <i>STAT2</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	55
<p>Διάγραμμα 3.5: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>MMP9</i> και <i>COX2</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	56
<p>Διάγραμμα 3.6: Σχετική έκφραση των γονιδίων <i>NFKB</i>, <i>RELA</i>, <i>MYD88</i> και <i>IRF5</i> σε <i>LPS</i> ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).</p>	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΙΑΟΥΡΤΙ

Το γιαούρτι είναι το πιο κοινό ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν παγκοσμίως. Ως ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, θεωρούνται αυτά, τα οποία παράγονται με ζύμωση του γάλακτος, το οποίο μπορεί να προέρχεται από προϊόντα που προκύπτουν από γάλα με ή χωρίς την τροποποίηση της σύστασής του. Η ζύμωσή τους γίνεται με τη δράση κατάλληλων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν πτώση του pH με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ή όχι ένα είδος πήγματος.

Με βάση τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ), χαρακτηρίζεται ως εκείνο το γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο παράγεται από την ζύμωση και πήξη του γάλακτος με χρήση υποχρεωτικά των καλλιεργειών- εκκινητών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμούμενο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10^7 cfu/g ζώντων οξυγαλακτικών βακτηρίων μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του (ΦΕΚ 2467/2016).

Η σύσταση του γιαουρτιού εξαρτάται κυρίως από την σύσταση της πρώτης ύλης από την οποία προήλθε, δηλαδή το γάλα. Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του γάλακτος είναι το είδος, η φυλή του ζώου, το στάδιο γαλακτικής περιόδου, ο τρόπος άμελξης, η διατροφή, οι συνθήκες εκτροφής, η επεξεργασία και η τυποποίησή του, τα οποία επηρεάζουν την τελική σύσταση του γιαουρτιού (Tamime & Robinson, 1999). Ο Codex Alimentarius ορίζει ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 2,7% και η περιεκτικότητα σε λίπος να μην ξεπερνά το 15%, όσον αφορά τη σύσταση του γιαουρτιού. Συγκεκριμένα, η ελληνική νομοθεσία έχει οριοθετήσει ως ελάχιστη τιμή για την πρωτεΐνη στο αγελαδινό και αίγιο γιαούρτι ορίζεται το 3,2% και για το πρόβειο το 5,5%, ενώ για συνδυασμό διαφορετικών ειδών γάλακτος ορίζεται ως ελάχιστη πρωτεΐνοπεριεκτικότητα, τιμή ενδιάμεση των παραπάνω και αντίστοιχη της αναλογίας των ειδών γάλακτος από το οποίο αποτελείται (Καρασταμάτης, 2019). Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες γιαουρτιού:

- ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ
- ΜΕ ΑΝΑΔΕΥΟΜΕΝΗ ΔΟΜΗ (stirred yoghurt)
- ΜΕ ΣΥΝΕΚΤΙΚΗ ΔΟΜΗ (set type yoghurt)
- ΣΤΡΑΓΓΙΣΤΟ ΓΙΑΟΥΡΤΙ

Από τον τελευταίο τύπο γιαουρτιού (Στραγγιστό) προέρχεται ο όξινος ορός. Ως στραγγιστό γιαούρτι ορίζεται με βάση τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, «το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι μετά από στράγγιση μέρους του ορού μετά την πήξη και έχει κατά ελάχιστο όγκο

5,6% πρωτεΐνες για το αγελαδινό ή αίγιο γάλα και 8% για το πρόβειο». Ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόζεται, το ποσοστό του ορού που αποβάλλεται μπορεί να ρυθμιστεί. Η αύξηση των στερεών επιτυγχάνεται, αν αποφευχθεί το στάδιο της στράγγισης, μέσω της προ- συμπίκνωσης του γάλακτος π.χ. με μεμβράνες υπερδιήθησης και ανασύστασης γάλακτος στα επιθυμητά στερεά συστατικά πριν τον εμβολιασμό και την παραγωγή γιαουρτιού, με μικρές διαφορές στο τελικό προϊόν (Ozer, 2006; Tamime *et al.*, 2014; Καρασταμάτης, 2019).

Μια άλλη κατηγορία είναι αυτή του παραδοσιακού γιαουρτιού. Πιο συγκεκριμένα, ο ΚΤΠ ορίζει ως παραδοσιακό γιαούρτι αυτό που παρασκευάζεται από την πήξη νοπού ή παστεριωμένου γάλακτος χωρίς καμία τροποποίηση της φυσικής του σύνθεσης, με μόνη εξαίρεση τη ρύθμιση της λιποπεριεκτικότητας. Η λιποπεριεκτικότητα ρυθμίζεται με αποτέλεσμα αυτό να διαθέτει τον χαρακτηριστικό υμένα, ο οποίος σχηματίζεται από τη φυσική αποκορύφωση του λίπους του γάλακτος. Συγκεκριμένα, το γάλα αφού καθαριστεί και ρυθμιστεί η λιποπεριεκτικότητά του, θερμαίνεται, με τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της θέρμανσης να ποικίλει ανάλογα με τον βαθμό μείωσης της υγρασίας, η οποία μπορεί να φτάσει έως και το 1/3 του αρχικού όγκου του γάλακτος (Tamime & Robinson, 1999).

Ένας άλλος τύπος γιαουρτιού είναι με αναδευόμενη δομή (stirred yoghurt), κατά το οποίο η δομή του πρέπει να είναι παχύρρευστη και ομοιογενής και η υφή του λεία (Robinson, 2006). Το γάλα προθερμαίνεται στους 55-70⁰ C και ομογενοποιείται σε πίεση π.χ. 17 MPa. Στη συνέχεια, ακολουθεί η βασική θέρμανση όπου εφαρμόζονται οι εξής θερμοκρασίες και χρόνοι: 80-85⁰ C για 30 min ή 90-95 για 5-10 min. Ακολούθως, το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία εμβολιασμού και επώάζεται υπό ανάδευση (Walstra *et al.*, 2006).

Η επόμενη κατηγορία είναι αυτή με συνεκτική δομή (set type yoghurt). Αυτό το είδος γιαουρτιού, χαρακτηρίζεται από λεία επιφάνεια, συνεκτική και ομοιογενή δομή σε όλο τον όγκο του και δεν πρέπει να υπάρχει καθόλου ορός (Robinson & Tamime 2006). Εδώ, το γάλα αφού καθαριστεί και τυποποιηθεί, προθερμαίνεται στους 55-70⁰ C και ομογενοποιείται σε πίεση π.χ. 17 MPa. Ακολουθεί η βασική θέρμανση και στη συνέχεια το γάλα ψύχεται περίπου στους 45⁰ C, όπου και εμβολιάζεται (Tamime *et al.*, 2014; Καρασταμάτης, 2019).

1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΡΑΓΓΙΣΤΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

A) ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗΣ

Σε αυτή την μέθοδο η αύξηση των στερεών συστατικών επιτυγχάνεται μέσω της διήθησης της πρώτης ύλης, υπό πίεση μέσα από ημιπερατές μεμβράνες, οι οποίες μπορούν να συγκρατήσουν συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ συστατικά όπως για παράδειγμα το νερό, το οποίο είναι χαμηλού μοριακού βάρους, περνάνε στο διήθημα. Το γιαούρτι πρέπει να αναδεύεται ελαφρά ούτως ώστε να ομογενοποιηθεί το πήγμα πριν περάσει από το στάδιο της υπερδιήθησης. Κατά την υπερδιήθηση, η θερμοκρασία του γιαουρτιού, κυμαίνεται στους 45-50⁰ C και η πίεση περίπου 0,7-0,8 MPa, έτσι ώστε η διαδικασία να είναι πιο εύκολη, χωρίς να δημιουργούνται προβλήματα στο τελικό προϊόν (Ozer, 2006; Καρασταμάτης, 2019).

B) ΣΤΡΑΓΓΙΣΗ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση ειδικών φυγοκεντρικών διαχωριστήρων (Nozzle seperators) κατά τους οποίους, συμβαίνει ο διαχωρισμός των στερεών υλικών από εναιωρήματα και συγκεκριμένα, στο γιαούρτι, ο διαχωρισμός του πηγματος από τον ορό. Το πήγμα μπορεί να υποστεί θέρμιση πριν την φυγοκέντριση έως και 3 λεπτά στους 50-60⁰ C, προκειμένου να διευκολυνθεί η αποβολή του ορού. Η διαδικασία της φυγοκέντρισης πραγματοποιείται στους 32-42⁰ C. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι, η επεξεργασία του πλήρους γιαουρτιού μπορεί να επιφέρει επιπλοκές, εξαιτίας της απόφραξης του στομίου του διαχωριστήρα από τα λιποσφαίρια, επομένως και η παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού μπορεί να πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το γιαούρτι προετοιμάζεται από άπαχο γάλα και φυγοκεντρείται και στο δεύτερο στάδιο αναμειγνύεται με παστεριωμένη κρέμα γάλακτος μέχρι να φτάσει την επιθυμητή λιποπεριεκτικότητα (Ozer, 2006; Καρασταμάτης, 2019).

Γ) ΣΤΡΑΓΓΙΣΗ ΜΕ ΣΑΚΟΥΣ

Αυτή η μέθοδος, βασίζεται στο φιλτράρισμα του πηγματος από κάποιο πορώδες υλικό, το οποίο συγκρατεί το πήγμα και αφήνει τον ορό να περάσει για αρκετό χρόνο, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή σύσταση. Στη βιομηχανία γίνεται χρήση υφασμάτων σάκων ποικίλης χωρητικότητας, στους οποίους τοποθετείται το γιαούρτι και αφού κρεμαστούν, ο ορός αποβάλλεται λόγω της βαρύτητας. Προκειμένου να αποβληθεί πιο γρήγορα ο ορός μπορεί να γίνει χρήση της πίεσης (περίπου 2 kg/ kg γιαουρτιού). Επιπλέον, ο χρόνος της στράγγισης μπορεί να είναι από 6 ώρες για τη στράγγιση υπό πίεση, μέχρι και 16-20 ώρες ή και παραπάνω για την απλή στράγγιση με βαρύτητα, αναλόγως το επιθυμητό προϊόν που θα παραχθεί. Έχει

αποδειχτεί ότι, οι χαμηλές τιμές οξύτητας αυξάνουν την αποβολή ορού και την απώλεια στερεών συστατικών στον ορό (Kehagias *et al.*, 1992). Η θερμοκρασία της στράγγισης είναι περίπου 10⁰ C. Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες στράγγισης καθώς και η πολύ υψηλή οξύτητα συνδέονται με την παραγωγή γιαουρτιού με αυξημένο ιξώδες και ανεπιθύμητη δομή (Ozer, 2006; Καρασταμάτης, 2019).

1.3 ΟΡΟΣ ΓΙΑΟΥΡΤΙΟΥ

Όξινος ορός με βάση τον Codex Alimentarius, είναι το υγρό που λαμβάνεται κατά την παρασκευή τυριού, καζεΐνης ή παρόμοιων προϊόντων, με το διαχωρισμό του από το τυρόπηγμα μετά από την πήξη του γάλακτος ή και των προϊόντων που προέρχονται από αυτό, όταν η διαδικασία της πήξης προέρχεται από την πτώση του pH.

Ο ορός του γιαουρτιού, είναι όξινου τύπου (acid whey), το οποίο οφείλεται στο μειωμένο pH (3,6-4,3) (Uduwerella *et al.*, 2018), και είναι αυτό, το οποίο τον διαχωρίζει από τον «γλυκό ορό» (sweet whey), δηλαδή το τυρόγαλα που προέρχεται από την τυροκόμηση. Ο όξινος ορός έχει μικρή περιεκτικότητα σε στερεά συστατικά, πρωτεΐνη και λίπος σε σχέση με τον γλυκό, ωστόσο χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα και από την απουσία του γλυκομακροπεπτιδίου, που είναι προϊόν της δράσης της χυμοσίνης (Macwan *et al.*, 2016; Καρασταμάτης, 2019). Ο όξινος ορός, θεωρείται υποπροϊόν και περιέχει τα υδατοδιαλυτά συστατικά του γάλακτος από το οποίο προήλθε, δηλαδή, λακτόζη, πρωτεΐνες του ορού, ανόργανα άλατα και ποσότητες γαλακτικού και οξικού οξέος σε συνδυασμό με τα άλλα συστατικά που προέρχονται κατά την στράγγιση (Thivend, 1978).

Πίνακας 1.3.1: Σύγκριση φυσικοχημικής σύστασης (%) γλυκού και όξινου ορού (Blaschek *et al.*, 2007).

Συστατικό/pH	Γλυκός ορός (τυρόγαλα)	Όξινος ορός
pH	6,0-6,5	3,5-4,5
Ολική πρωτεΐνη	0,65-0,96	0,37-0,65
Λακτόζη	3,9-4,8	4,2-4,9
Γαλακτικό οξύ	0,05	0,6-0,7

1.3.1 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ

Ο όξινος ορός περιέχει πολλές οργανικές ουσίες, με αποτέλεσμα όταν αυτό αποβάλλεται στο περιβάλλον, να προκαλεί σοβαρή ρύπανση, ειδικά στα υδάτινα οικοσυστήματα, στα οποία αποβάλλεται. Αυτό οφείλεται στην αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας του από τους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάσπαση της οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς δεσμεύεται οξυγόνο, το οποίο σε υδάτινο οικοσύστημα είναι περιορισμένο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωσή του στο νερό και η διαθεσιμότητά του για τους υπόλοιπους υδρόβιους οργανισμούς επηρεάζοντάς τους αρνητικά, με επακόλουθο να επιφέρει ακόμα και τον θάνατό τους. Το μολυσματικό φορτίο των αποβλήτων μπορεί να υπολογιστεί με τον δείκτη BOD₅. Το BOD (Biochemical Oxygen Demand) ή βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο, είναι το οξυγόνο που απαιτείται από τους μικροοργανισμούς για τη διάσπαση οργανικών ενώσεων των αποβλήτων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Το BOD υπολογίζεται για συγκεκριμένα απόβλητα και αυξάνεται συναρτήσεως του χρόνου. Όσο περισσότερο εκτίθενται τα απόβλητα στους μικροοργανισμούς, τόσο μεγαλύτερο μέρος του θα διασπάται, με τις τιμές τις πρώτες ημέρες να έχουν υψηλότερο ρυθμό διάσπασης, ενώ αργότερα μειώνεται (Delzer & McKenzie, 1999).

Ο όξινος ορός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιος μετά από επεξεργασία ή και ως πρώτη ύλη από την βιομηχανία για την αξιοποίηση των συστατικών του. Περιέχει συστατικά υψηλής βιολογικής αξίας όπως πρωτεΐνες, λακτόζη και ιχνοστοιχεία, τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και σε άλλους τομείς. Ωστόσο, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ μπορεί να προκαλέσει προβλήματα κατά τη μετατροπή του σε σκόνη (συσσωμάτωση) (Chandrapala *et al.*, 2015), ενώ κατά τη μείωση της υγρασίας του λόγω των κρυστάλλων της λακτόζης που σχηματίζονται, είναι πιθανόν να παρουσιάζει προβλήματα στην διαχείρισή του. Επιπρόσθετα, λόγω των θερμοευαίσθητων πρωτεϊνών, που περιέχει, η εφαρμογή σε υψηλές θερμοκρασιών κατά την επεξεργασία του, ενδέχεται να υποβαθμίσει το τελικό προϊόν (Tsakali *et al.*, 2010). Επίσης, το χαμηλό pH του ορού και η αυξημένη περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία, προκαλεί ορισμένα προβλήματα εξαιτίας της γεύσης που προσδίδει στα προϊόντα (Macwan *et al.*, 2016).

Ο όξινος ορός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γεωργία, ως λίπασμα που είτε προστίθεται απευθείας στο έδαφος, είτε αναμιγνύεται με κοπριά πριν εφαρμοστεί στις καλλιεργήσιμες εκτάσεις (Ketterings *et al.*, 2017). Ο ορός, εξαιτίας των ιχνοστοιχείων που διαθέτει και σε συνδυασμό με τις ποσότητες που παράγονται, δύναται να αποτελέσει οικονομικό και αποτελεσματικό λίπασμα, με αποτέλεσμα την βελτίωση της γονιμότητας και της δομής του εδάφους (Macwan *et al.*, 2016). Επίσης, ο όξινος ορός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως

ζωοτροφή, προσθέτοντάς το στο ενσίρωμα στα παραγωγικά ζώα είτε σε υγρή μορφή είτε σε συμπυκνωμένη ή σε μορφή σκόνης μετά από ενσωμάτωση στο συμπυκνωμένο σιτηρέσιο (Thivend, 1978).

1.4 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΡΟΥ

Οι πρωτεΐνες του ορού ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών του γάλακτος που παραμένουν διαλυτές σε pH 4,6 στους 20⁰ C καθώς και κατά την πήξη του γάλακτος με αποτέλεσμα ένα ποσοστό να απομακρύνεται με το τυρόγαλα κατά την τυροκόμηση (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Η βιοδραστικότητα των πρωτεϊνών του ορού σχετίζεται άμεσα με τις δομικές ιδιότητές τους. Μπορούν να λειτουργήσουν ως πλήρες μόρια ή ως μερικώς υδρολυμένα ή μικρά βιοενεργά πεπτίδια. Περιλαμβάνουν ευεργετικές επιδράσεις, όπως την βελτιωμένη πεπτικότητα και τη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών, μεταξύ άλλων. Οι πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες του ορού είναι η α- λακταλβουμίνη, η β- λακτογλοβουλίνη, οι ανοσοσφαιρίνες, η αλβουμίνη ορού και η ομάδα πρωτεοζών- πεπτονών. Οι παραπάνω πρωτεΐνες με εξαίρεση την ομάδα πρωτεοζών- πεπτονών είναι σφαιρικές, υδρόφοβες πρωτεΐνες με δομές α- έλικα και β- πτυχωτή επιφάνεια. Η β- λακτογλοβουλίνη, είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη ορού είναι και η ποσότητά της είναι σχεδόν διπλάσια της α- λακταλβουμίνης σε όλα τα είδη γάλακτος με εξαίρεση το αίγαιο, στο οποίο οι δύο αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται σε ίσες συγκεντρώσεις (Μοάτσου, 2009; Madureira *et al.*, 2007).

Πίνακας 1.4.1: Πρωτεΐνες ορού του αγελαδινού γάλακτος (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009).

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΡΟΥ	g/L	% ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Σύνολο	6,3	19,3
β- λακταλβουμίνη	3,2	9,8
α- λακταλβουμίνη	1,2	3,7
Αλβουμίνη ορού	0,4	1,2
ανοσοσφαιρίνες	0,7	2,1
Πρωτεόζες- πεπτόνες	0,8	2,4

1.4.1 β- ΛΑΚΤΟΓΛΟΒΟΥΛΙΝΗ (β-Ig)

Η β- λακτογλοβουλίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού γάλακτος, η οποία αποτελείται από 162 αμινοξέα και μοριακό βάρος 36.600 da. Βιοσυντίθεται στο μαστό και στη δομή της περιλαμβάνονται δύο δισουλφιδικοί δεσμοί (S-S), καθώς και μία σουλφυδρική ομάδα στο εσωτερικό της, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στη φυσική της κατάσταση. Η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν τη δομή της, ενώ η ευαισθησία της στην θέρμανση επηρεάζει την τεχνολογική της συμπεριφορά (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Πιο συγκεκριμένα, στο pH του γάλακτος απαντάται με τη μορφή διμερών, ενώ σε pH <5,5 σχηματίζει οκταμερή, ενώ σε pH<3,5 και pH>7,5 εμφανίζεται με τη μορφή μονομερών. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή, παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές, με πιο συχνές τις β-Ig A και β-Ig B. Άλλες βιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης είναι η ανοσορυθμιστική, η αντιυπερτασική και η αντικαρκινική δράση της, η οποία οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά της στο απαραίτητο αμινοξύ κυστεΐνη (Cys). Το συγκεκριμένο αμινοξύ, συθέτει την γλουταθειόνη, το οποίο είναι ένα αντικαρκινικό τριπεπτίδιο που παράγεται στο συκώτι και προστατεύει από εντερικούς όγκους, από το οξειδωτικό στρες και συμβάλλει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Geoffrey & Krissansen, 2007; Madureira *et al.*, 2007; Piccolomini *et al.*, 2012).

1.4.2 α- ΛΑΚΤΑΛΒΟΥΜΙΝΗ (α-Ia)

Η α- λακταλβουμίνη είναι ένα μικρό σφαιρικό μόριο, το οποίο δεν σχηματίζει διμερή ή πολυμερή και είναι λιγότερο ευαίσθητη στη θέρμανση από τη β- λακτογλοβουλίνη (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Συντίθεται και αυτή στο μαστό και αποτελείται από 123 αμινοξέα. Στο εσωτερικό της προσδένεται από ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺), τα οποία σταθεροποιούν την δομή της, ενώ η μείωση του pH απομακρύνει τα ιόντα αυτά και επομένως καθίσταται ευαίσθητη στη θέρμανση. Ο βιολογικός της ρόλος εντοπίζεται στο ότι δρα ως συνένζυμο της σύνθεσης της λακτόζης (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Επίσης, έχει αποδειχτεί πως διαθέτει αντικαρκινική δράση, καθώς σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το ελαϊκό οξύ που ονομάζεται BAMLET και στην περίπτωση της ανθρώπινης πρωτεΐνης HAMLET, τα οποία αποκτούν αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω της θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων, της πρόκλησης λυσοσωματικής αποσταθεροποίησης και της προώθησης του κυτταρικού θανάτου. Τα σύμπλοκα αυτά, μπορούν να είναι μια νέα θεραπευτική επιλογή για επιθετικές μορφές καρκίνου (Rammer *et al.*, 2010). Γενικά, οι ευεργετικές επιδράσεις της πρωτεΐνης στην ανθρώπινη υγεία προέρχονται 1) από ολόκληρη την πρωτεΐνη, ή 2) από πεπτίδια που προέρχονται από υδρόλυση της πρωτεΐνης, ή 3) από αμινοξέα που προκύπτουν από την πλήρη πέψη της, καθώς η α-Ia αποτελεί σημαντική πηγή των αμινοξέων κυστεΐνη (Cys) και

τρυπτοφάνη (Trp), τα οποία είναι πρόδρομες ενώσεις της σεροτονίνης και γλουταθειόνης, αντίστοιχα (Chatterton *et al.*, 2006; Kannekanian, 2014).

Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, στην βρεφική ηλικία (μέχρι 3 ετών) παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό αλλεργιών, βελτιώνει την ανοσοαπόκριση, προάγει την εντερική υγεία και αυξάνει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ιδιαίτερα του σιδήρου και ψευδαργύρου. Στους ενήλικες, η πρωτεόλυση της α-1α παράγει βιοδραστικά πεπτίδια με πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου όπως ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές, αντιβακτηριακές και πρεβιοτικές ιδιότητες και αυξάνει την πρωτεΐνη στους σκελετικούς μύες (Layman *et al.*, 2018).

1.4.3 ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΗ Ή ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΟΡΟΥ (Blood Serum Albumin, BSA)

Η αλβουμίνη ορού είναι ένα μεγάλο μακρόστενο μόριο, το οποίο αποτελείται από 582 αμινοξέα, 17 S-S δεσμούς και μία SH ομάδα. Η παρουσία της αλβουμίνης του ορού στο γάλα οφείλεται σε «διαρροή» από το αίμα του ζώου (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009).

1.4.4 ΑΝΟΣΟΓΛΟΒΟΥΛΙΝΕΣ Ή ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ (IMMUNOGLOBULINS, IGS)

Οι ανοσογλοβουλίνες ή ανοσοφαιρίνες είναι μια ετερογενής ομάδα αντισωμάτων μεγάλου μοριακού βάρους που παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Αυτές οι πρωτεΐνες καταλαμβάνουν υψηλές συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα και έχουν την ιδιότητα να περνούν άθικτες από το γαστρεντερικό σύστημα του νεογνού στο αίμα ενισχύοντας, έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα. Υπάρχουν πέντε ομάδες ανοσογλοβουλινών, όμως στο γάλα απαντώνται οι τρεις από αυτές, οι IgG, IgA και IgM (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009).

Η IgG βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο γάλα. Είναι ένα πολυμερές μόριο, το οποίο αποτελείται από δύο βαριές (heavy) και δύο ελαφριές (light) αλυσίδες με μοριακό βάρος 150.000 da.

Η IgM είναι ένα πενταμερές συστατικό τύπου IgG με αρκετά μεγάλο μοριακό βάρος (περίπου 900.000 da). Τα αντισώματα αυτά, έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών μεμβρανών βακτηρίων και ιών, λόγω του ότι προκαλούν συσσωμάτωση των σωματιδίων (αγλουτινίνες ή συγκολλητίνες). Επιπλέον, σε αυτή την κατηγορία αντισωμάτων περιέχονται και οι λακτενίνες (L1, L3), οι οποίες είναι αντισώματα έναντι ορισμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* και περιλαμβάνει τουλάχιστον μία

κρουογλοβουλίνη, η οποία εμπλέκεται στη συσσωμάτωση των λιποσφαιρίων (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Έχει αποδειχτεί για τις ανοσογλοβουλίνες ότι αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλουταθειόνης, που είναι το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό των κυττάρων και έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τοξίνες και ιούς (Kanekanian, 2014).

1.4.5 ΠΡΩΤΕΟΖΕΣ- ΠΕΠΤΟΝΕΣ (PP)

Οι πρωτεόζες- πεπτόνες παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες ορού. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στη θέρμανση και κατακρημνίζονται με 12% τριχλωρικό οξύ. Επίσης, σε αυτήν την κατηγορία, ανήκει μια ομάδα συστατικών, των οποίων το μεγαλύτερο μέρος αποτελείται από τμήματα της β- καζεΐνης. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη ομάδα ανήκει και μια γλυκοπρωτεΐνη (PP3) της μεμβράνης των λιποσφαιρίων, η οποία έχει την ικανότητα να παράγει αντισώματα στα ανθρώπινα κύτταρα (Μοάτσου & Καμινारीδης, 2009; Geoffrey & Krissansen, 2007). Σε κανονικό pH του γάλακτος, οι πρωτεόζες- πεπτόνες, παραμένουν στα καζεϊνικά μικκύλια, ενώ κατά την οξίνιση (χαμηλό PH) μεταφέρονται όλες στον ορό (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009).

1.4.6 ΛΑΚΤΟΦΕΡΙΝΗ (ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΕΡΙΝΗ)

Η λακτοφερίνη είναι ένα μόριο με αντιμικροβιακές, ανοσορυθμιστικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Κυρίως, όμως, έχει την ικανότητα να επιτρέπει τη δέσμευση και την αποτελεσματική μεταφορά του σιδήρου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα) καθώς και την αδρανοποίηση ορισμένων επιβλαβών μικροοργανισμών (Legrand, *et al.*, 2005; Madureira *et al.*, 2007; Μοάτσου & Καμινारीδης, 2009). Επίσης, η συγκέντρωσή της στο γάλα της αγελάδας είναι σχετικά χαμηλή (περίπου 0,05-0,2 ml/mL) σε σχέση με το πρόβειο (περίπου 0,1 ml/mL) και αίγιο (περίπου 0,12 ml/mL) (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009).

1.5 ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Ως βιοενεργά (βιοδραστικά ή βιολειτουργικά) συστατικά παρουσιάζονται τα συστατικά που εμφανίζονται σε μικρές ποσότητες στα τρόφιμα και μπορούν να διενεργήσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού. Είναι ουσίες, οι οποίες εντοπίζονται σε ζωικά και φυτικά τρόφιμα και που από *in vivo* μελέτες με ζώα έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας, είτε βοηθώντας στη λειτουργία συγκεκριμένων συστημάτων του οργανισμού, είτε μέσω της μείωσης του κινδύνου της εμφάνισης ασθενειών (Kris-Etherton *et*

al.,2002; Κουτελιδάκης, 2015). Οι ουσίες αυτές μπορεί να βρίσκονται στα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, μέταλλα και βιταμίνες) ή σε προϊόντα διάσπασης των μακροθρεπτικών συστατικών (βιοενεργά πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες) (Kanekanian, 2014; Κουτελιδάκης, 2015). Στα βιοενεργά συστατικά του γάλακτος ανήκουν οι πρωτεΐνες, η λακτόζη, τα πεπτίδια που προέρχονται από την υδρόλυση, οι βιταμίνες και τα μέταλλα (Madureira *et al.*, 2007; Giromini *et al.*, 2019). Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (κυρίως β- λακταλβουμίνη, α- λακταλβουμίνη) έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, λόγω της υψηλής ποιότητας των αμινοξέων που περιέχουν (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, στην ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα και το νευρικό σύστημα) (Da Silva, *et al.*, 2017).

1.5.1 ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι βιολογικής αξίας, επειδή αποτελούν πηγές βιοενεργών πεπτιδίων. Όταν είναι ενσωματωμένα στην αμινοξική ακολουθία της μητρικής πρωτεΐνης παραμένουν αδρανή, ωστόσο ενεργοποιούνται όταν απελευθερώνονται από αυτή. Αυτά τα πεπτίδια έχουν την ικανότητα να παράγονται κατά την ενζυμική υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος στο πεπτικό σύστημα, ή μετά από ζύμωση του γάλακτος με καλλιέργειες εκκίνησης, είτε μετά από πρωτεόλυση με μικροβιακά ή φυτικά ένζυμα. Έχουν θετική επίδραση στη λειτουργία των οργάνων καθώς και στα κύρια συστήματα του ανθρώπινου σώματος. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση τους είναι η ανθεκτικότητά τους σε περαιτέρω υδρολύσεις από τα ένζυμα του εντέρου είτε από τις πεπτιδάσες του ορού του αίματος (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009). Στον πίνακα 1.5.1 παρουσιάζονται παραδείγματα βιοενεργών πεπτιδίων του γάλακτος καθώς και η κύρια δράση τους.

Πίνακας 1.5.1: Βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος, η προέλευσή τους και η κύρια δράση τους.

ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΚΥΡΙΑ ΔΡΑΣΗ	ΠΗΓΗ
Καζορφίνες	β- καζεΐνη	Οπιοειδής (αγωνιστή ή ανταγωνιστή)	Schlimme and Meisel, (1995)
Λακτορφίνες	πρωτεΐνες ορού		
Λακτοφεροξίνη	Λακτοφερίνη		
Καζοξίνη	κ- καζεΐνη		
Καζοκινίνες	καζεΐνες	Αντιπερτασική/ Αντιθρομβωτική	Silva & Malcata, 2005
Λακτοκινίνες	πρωτεΐνες ορού		
Καζοπλατελίνη	καζεΐνομακροπεπίδιο	Αντιθρομβωτική	
Καζεΐνοφωσφοπεπίδια	καζεΐνες	Πρόσδεση μετάλλων	Nongonierma & FitzGerald, 2015
Καζεΐνοφωσφοπεπίδια	Καζεΐνες ή καζεΐνομακροπεπίδιο	Αντι-τερηδονική	
Κασοσιδίνες	καζεΐνες	Αντιβακτηριακή	Silva and Malcata, 2005
Καζεΐνοφωσφοπεπίδια	Καζεΐνες ή καζεΐνομακροπεπίδιο	Κυτταρορυθμιστική/ Ανοσολογική	Silva & Malcata, 2005
Σερορφίνη	πρωτεΐνες ορού	Οπιοειδής (αγωνιστής)	Park & Nam, 2015
IgG, IgA	πρωτεΐνες ορού	Ανοσοτροποποιητική	
Λακτοφερίνη	πρωτεΐνες ορού	Αντιμικροβιακή, Ανοσοτροποποιητική	Giansati <i>et al.</i> , 2016, Bruni <i>et al.</i> , 2016
Λακτοφεραμπίνη	πρωτεΐνες ορού	Αντιβακτηριακή, Αντιμυκητιακή, Αντιπαρασιτική	
(γλυκο)μακροπεπίδιο (GMP)	πρωτεΐνες ορού	Ανοσορυθμιστική	Dalbeth <i>et al.</i> , 2010

Οι παραπάνω δράσεις έχουν την ικανότητα να εκδηλώνονται είτε τοπικά, όπως για παράδειγμα η αντιμικροβιακή δράση εντός του γαστρεντερικού σωλήνα, είτε μέσω της πρόσδεσης των πεπτιδίων σε ειδικούς υποδοχείς των εξωκυτταρικών μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος να μεταφέρονται στο όργανο- στόχο (Kanekanian, 2015).

Οι πρωτεΐνες του ορού έχει αναφερθεί πως έχουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, οι οποίες επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση και

πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, στην παραγωγή αντισωμάτων, στην έκφραση κυτοκινών, χημειοκινών και ιντερλευκινών, καθώς και στην φαγοκυτταρική δράση των μακροφάγων (Gill *et al.*, 2000; Korhonen & Pihlanto 2006; Gauthier *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2010; Pihlanto, 2011; Mohanty *et al.*, 2015; Theodorou & Politis, 2016; Da Silva *et al.*, 2017; Gupta & Prakash, 2017; Mann *et al.*, 2019). Η λακτοφερίνη των βοοειδών κατά την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει την δραστηριότητα των μακροφάγων, προκαλεί επαγωγή των προ-φλεγμονοδών κυτοκινών, δηλαδή της ιντερλευκίνης-8 (IL8), της ιντερλευκόνης-6 (IL6), της ιντερλευκίνης-1B (IL1B) καθώς και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFA), αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα (Gauthier *et al.*, 2006; Madureira *et al.*, 2007; Gupta & Prakash, 2017). Επιπλέον, μια άλλη ομάδα πεπτιδίων, η οποία αξίζει να αναφερθεί για την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι οι αναστολείς του ενζύμου ACE (Angiotensin Converting Enzyme). Τα πεπτίδια αυτά, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν το ένζυμο ACE, ευνοώντας τον σχηματισμό της βραδυκινίνης, η οποία μεσολαβεί στην οξεία φλεγμονή. Πιο συγκεκριμένα, η βραδυκινίνη διεγείρει τα μακροφάγα προκειμένου να ενισχύσει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και να αυξήσει την έκκριση των λεμφοκινών (Haque *et al.*, 2009). Επίσης, και το (γλυκο)μακροπεπτίδιο (GMP) παρουσιάζει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, έχει ανοσοκατασταλτική επίδραση στην παραγωγή αντισωμάτων IgG και αντι-φλεγμονώδη δράση μέσω της καταστολής της έκφρασης των κυτοκινών ιντερλευκίνη-8 (IL8), ιντερλευκίνη-1b (IL1b) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFα), σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Dalbeth *et al.*, 2010; Da Silva & Rudkowska, 2015).

Ακόμα, η διάσπαση των πρωτεϊνών του ορού, α-λακταλβουμίνης και β-λακτογλοβουλίνη από πεπτικά ένζυμα, όπως τρυψίνη/χυμοτρυψίνη, έχει την ιδιότητα να απελευθερώνει πεπτίδια, τα οποία επιδρούν στην ανοσολογική απόκριση μέσω της διέγερσης του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (θραύσματα της β-Lg: f15-20, f55-60, f84-91, f92-105, f139-148, f142-148, και της α-La: f10-16), της έκκρισης κυτοκινών (β-Lg: f15-20, f55-60, f139-148, καθώς και της αντιμικροβιακής δράσης έναντι Gram θετικών βακτηρίων (β-Lg: f15-20, f25-40, f78-83, f92-100) υποβοηθώντας στην άμυνα του οργανισμού (Mercier *et al.*, 2004; Jacquot *et al.*, 2010; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2011; Da Silva & Rudkowska, 2015; Mann *et al.*, 2019).

Τα πεπτίδια αυτά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα προς όφελος της υγείας του ανοσοποιητικού συστήματος παρέχοντας προστασία από λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια και ιούς. Χαρακτηριστικό είναι πως η αργινίνη στο N- ή C-τελικό άκρο των πεπτιδίων αποτελεί δομικό στοιχείο, το οποίο αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς

πρόσδεσης στη μεμβράνη των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Gauthier *et al.*, 2006; Haque *et al.*, 2009).

1.6 ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη αποτελεί τον κύριο υδατάνθρακα του γάλακτος. Είναι ένας δισακχαρίτης, ο οποίος απαντάται μόνο στο γάλα. Αποτελείται από ένα μόριο D-γαλακτόζης και ένα μόριο D-γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους με έναν β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και συντίθεται στις μεμβράνες των οργανιδίων Golgi των γαλακτικών κυττάρων του μαστικού αδένα από τη γλυκόζη του αίματος (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009). Η λακτόζη παίζει σημαντικό ρόλο για το γάλα και τα προϊόντα του. Πιο συγκεκριμένα, προσδίδει στο γάλα ελαφρώς γλυκιά γεύση, συμμετέχει στην αντίδραση Maillard και επομένως διαμορφώνει τη γεύση και το χρώμα στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία υφίστανται θερμική επεξεργασία. Αποτελεί πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό αφού διασπαστεί πρώτα σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση (λακτάση) του πεπτικού συστήματος. Επίσης, ενισχύει την απορρόφηση μεταλλικών στοιχείων (πχ. Ca, Mg, Fe, Co, Zn) από την μεμβράνη του εντέρου και θεωρείται είναι συμπληρωματική της βιταμίνης D σχετικά με την απορρόφηση του ασβεστίου από το γάλα. Αποτελεί, την κύρια πηγή άνθρακα των οξυγαλακτικών βακτηρίων που βρίσκονται στο γάλα και πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το αποτέλεσμα της ζύμωσης μπορεί να είναι η ανεπιθύμητη οξίνιση του γάλακτος ή η παραγωγή ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι. Η συγκέντρωσή της στο γάλα επηρεάζεται μόνο από το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και από την κατάσταση υγείας του μαστού, και όχι από την διατροφή και την φυλή του ζώου. Η συγκέντρωσή της μειώνεται καθώς προχωρά η γαλακτική περίοδος και εφόσον αυξάνεται ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο γάλα, το οποίο είναι ένδειξη φλεγμονής του μαστού, δηλαδή μαστίτιδα (Μοάτσου και Καμινारीδης, 2009).

1.7 ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΑΛΑΤΑ

Η σύσταση των αλάτων του γάλακτος επηρεάζεται από το είδος του ζώου. Ωστόσο, για το ίδιο είδος ζώου επηρεάζεται από τη φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, τη διατροφή και την κατάσταση υγείας του μαστού (μαστίτιδες). Ορισμένα άλατα όπως τα χλωριούχα και τα άλατα του νατρίου και του καλίου, βρίσκονται εξ ολοκλήρου στον ορό του γάλακτος επειδή έχουν υψηλή διαλυτότητα. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου ξεπερνούν τη διαλυτότητά τους υπό τις συνθήκες που επικρατούν στο γάλα. Επομένως, ένα μέρος τους

υπάρχει διαλυτό στον ορό και ένα μέρος τους εντοπίζεται στην κολλοειδή φάση του γάλακτος συνδεδεμένο με τα καζεϊνικά μικκύλια (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009). Στον πίνακα 1.8.1 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του αγελαδινού γάλακτος σε κύρια ανόργανα συστατικά.

Πίνακας 1.7.1: Περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος σε κύρια ανόργανα συστατικά (Μοάτσου και Καμιναρίδης, 2009).

ΚΥΡΙΑ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/L
Νάτριο	350-900
Κάλιο	1100-1700
Χλώριο	900-1300
Ασβέστιο	1100-1300
Μαγνήσιο	90-140
Φώσφορος	900-1000

1.8 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Στο γάλα περιέχονται όλες οι βιταμίνες. Οι βιταμίνες χωρίζονται με βάση τη διαλυτότητά τους στο νερό σε δύο κατηγορίες α) λιποδιαλυτές βιταμίνες (Α, D, Ε, Κ) και β) υδατοδιαλυτές βιταμίνες (Β1, Β2, Β12, C φυλλικό οξύ). Στον πίνακα 1.9.1 παρουσιάζονται οι βιταμίνες που περιέχονται στο γάλα.

Πίνακας 1.8.1: Οι κυριότερες βιταμίνες που περιέχονται στο γάλα ανά 100g προϊόντος (Tamime and Robinson, 1999).

ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	ΓΑΛΛΑ
Βιταμίνη Α	52
Καροτένιο	21
Θειαμίνη (B1)	30
Ριβοφλαβίνη (B2)	170
Πυροδοξίνη (B6)	60
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	0,4

1.9 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.9.1 ΕΜΦΥΤΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα δίκτυο κυττάρων, ιστών και οργάνων. Ο ρόλος του είναι η άμυνα του οργανισμού ενάντια σε βακτήρια, μικρόβια, ιούς και τοξίνες καθώς και σε παράσιτα που μπορεί να εισβάλλουν στο σώμα. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στην συνολική ομοιόσταση στο σώμα και ως εκ τούτου να ανταποκρίνεται όχι μόνο σε εξωγενή αλλά και σε ενδογενή «σήματα κινδύνου». Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο τύπους ανοσίας, την έμφυτη ή μη ειδική (innate immunity) και την προσαρμοστική ή επίκτητη ανοσία (specific immunity) (Chanput, 2012). Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στο αντιγόνο και παρέχει άμεσες αλλά μη ειδικές αποκρίσεις ως προς τα αντιγόνα τα οποία αναγνωρίζει. Η επίκτητη ανοσία, η οποία ενεργοποιείται από την έμφυτη απόκριση, δηλαδή μετά την εισβολή του αντιγόνου στον οργανισμό και μπορεί να διαρκέσει από μερικές ημέρες έως και εβδομάδες, έχει ισχυρότερες και πολύ συγκεκριμένες αποκρίσεις και αναπτύσσει μία μνήμη όπου μέσω αυτής θυμάται συγκεκριμένους εισβολείς και δημιουργεί ταχύτερη και ισχυρότερη ανταπόκριση σε επαναλαμβανόμενες μολύνσεις από το ίδιο αντιγόνο (Chanput, 2012). Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας είναι τα φαγοκυτταρικά κύτταρα, δηλαδή τα ουδετερόφιλα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer, NK) και τα μονοκύτταρα, ενώ της επίκτητης ανοσίας είναι τα Β- και Τ- λεμφοκύτταρα (Bouman *et al.*, 2004).

1.9.2 ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ- ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα μακροφάγα, τα οποία προήλθαν από μονοκύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί. Τα μονοκύτταρα είναι τα πρόδρομα κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος, τα οποία παράγονται στο μυελό των οστών και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα κατά την μεταφορά τους από την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς, όταν επικρατεί φλεγμονή (Kanekanian, 2014). Τα μακροφάγα αποτελούν μέρος της έμφυτης ανοσίας που ανιχνεύει και εξαλείφει τα εισβάλλοντα μικρόβια και τοξικά μόρια. Οι κύριες λειτουργίες των μακροφάγων είναι η συμμετοχή στην επούλωση των πληγών, η αντιμετώπιση της φλεγμονής, ο συντονισμός της κυτταρικής μετανάστευσης και η αναδιαμόρφωση των ιστών (Chanput, 2012). Επίσης, τα μακροφάγα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ενεργοποίησης ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον τους. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα κλασσικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή μακροφάγα M1, τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα κατά της βακτηριακής και ιογενούς λοίμωξης και αυξάνουν την παραγωγή προ- φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNFA) και οι ιντερλευκίνες IL1B, IL6, IL8, IL12 (Chanput *et al.*, 2013; Milan-Linares *et al.*, 2014). Ο φαινότυπος M1 προκύπτει από την έκθεση των μακροφάγων σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και σε IFN-γ (Okabe & Medzhitov, 2014). Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή μακροφάγα M2, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης, στις αλλεργίες και στην εξέλιξη των όγκων. Σε αυτή την κατηγορία τα μακροφάγα προκύπτουν από την έκθεση των κυττάρων σε προ- φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως για παράδειγμα οι ιντερλευκίνες IL4 (Chanput *et al.*, 2013).

1.9.3 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ

Οι κυτοκίνες (cytokines) είναι διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ρόλος τους είναι να συντονίζουν τη λειτουργία πολλών διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσιακή απόκριση. Οι κυτοκίνες έχουν τρεις κατηγορίες δράσεις: Α) την αυτοκρινή, όταν προσκολλώνται σε υποδοχείς του ίδιου κυττάρου που τις εκκρίνει, Β) την παρακρινή, όταν προσκολλώνται σε υποδοχείς κυττάρων- στόχων που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο, το οποίο τις εκκρίνει, Γ) την ενδοκρινή, όταν προσκολλώνται σε υποδοχείς κυττάρων που βρίσκονται μακριά από το κύτταρο, το οποίο τις εκκρίνει. Όσον αφορά την δομή των κυτοκινών αυτές διακρίνονται σε: 1) ιντερλευκίνες (interleukins, ILs), 2) ιντερφερόνες (interferons, IFNs), 3) παράγοντες νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNFA), 4) διεγερτικοί παράγοντες αποικιών (Colony Stimulating Factors, CSFs), 5)

χημειοκίνες. Τα χαρακτηριστικά των κυτοκινών είναι: α) ο πλειοτροπισμός, δηλαδή η ικανότητα της κυτοκίνης να ασκεί διαφορετικές βιολογικές δράσεις σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς, β) ο πλεονασμός, δηλαδή όταν διαφορετικές κυτοκίνες εκτελούν την ίδια δράση, γ) η συνεργιστική δράση, δηλαδή όταν δύο διαφορετικές κυτοκίνες συνεργάζονται και εκτελούν την ίδια δράση στα κύτταρα- στόχο, δ) η ανταγωνιστική δράση, όταν μία κυτοκίνη εμποδίζει την δράση μιας άλλης (Radford- Smith & Jewell, 1994; Abbas & Lichtman, 2011).

1.9.4 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ *IN VITRO* ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ ΓΙΑΟΥΡΤΗΣ

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση *in vitro* της γαστρεντερικής πέψης στα δείγματα του όξινου ορού γιαούρτης, σε συνθήκες όμοιες με αυτές που επικρατούν στη φυσιολογική πέψη ενός τροφίμου εντός του ανθρώπινου οργανισμού κατά την διάρκεια της κατάποσης. Η πειραματική διαδικασία έγινε με βάση τα πρωτόκολλα ενός στατικού μοντέλου πέψης, των Brodtkorb *et al.*, (2019) και Minekus *et al.*, (2014). Αυτό το μοντέλο αποτελείται από τις τρεις διαδοχικές φάσεις της πέψης (στοματική, γαστρική, εντερική) και το χειρισμό του τελικού δείγματος μετά την πέψη. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η μίμηση της διέλευσης του τροφίμου από το στόμα (στοματική φάση), το στομάχι (γαστρική φάση) και το έντερο (εντερική φάση) κατά την πέψη μέσω της προσθήκης κατάλληλων διαλυμάτων, τη ρύθμιση του pH και την επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, το INFOGEST είναι ένα πρωτόκολλο προσομοίωσης γαστρεντερικής πέψης, το οποίο βασίζεται σε μια διεθνή συνεργασία που αναπτύχθηκε από το Δίκτυο COST INFOGEST με σκοπό να εξαλείψει τις διαφορές στη μεθοδολογία που παρουσιάζονται σε *in vitro* συστήματα προσομοίωσης της πέψης, έτσι ώστε να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα στην επίδραση διαφόρων βιολειτουργικών τροφίμων.

1.9.5 THP-1 ΚΥΤΤΑΡΑ

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε μία ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, η THP-1, η οποία παραχωρήθηκε από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Τα THP-1 κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των μονοκυττάρων και μέσα από μια *in vitro* διαδικασία μπορούν να μετατραπούν σε μακροφάγα. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται από ανθρώπινα μονοκύτταρα οξείας μορφής λευχαιμίας, η οποία απομονώθηκε από το αίμα αρσενικού ασθενούς ηλικίας 1 έτους. Τα μονοκύτταρα αυτής της σειράς είναι στρογγυλά με χρόνο διπλασιασμού 20-48 ώρες και χρησιμοποιείται ως μοντέλο μελέτης της ανοσορυθμιστικής απόκρισης σε βιοενεργά συστατικά διαφόρων τροφίμων, επειδή

παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως: α) ομοιότητα στις αποκρίσεις με το αντίστοιχο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερειακού αίματος (Chanput *et al.*, 2010), β) είναι κυτταρικές σειρές, οι οποίες μπορούν να διατηρηθούν πολλές γενιές και να καλλιεργηθούν ξανά χωρίς μεταβολές στη δραστηριότητα και την ευαισθησία των κυττάρων (Bosshart & Heinzelmann, 2016), γ) αποθηκεύονται για μεγάλο διάστημα χωρίς να επηρεάζεται η ζωτικότητα και τα χαρακτηριστικά των μονοκύτταρων- μακροφάγων, δ) μπορεί να πολλαπλασιάζεται ταχύτατα με αποτέλεσμα να υπάρχει υψηλή απόδοση σε αριθμό κυττάρων.

1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση της επίδρασης όξινου ορού γιαούρτης, σε ανοσοϊκανά κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης, έτσι ώστε να αξιολογηθεί ως βιολειτουργικό πρόσθετο σε τρόφιμα. Επίσης, σκοπός είναι να αξιολογηθεί η επίδραση της ζωικής προέλευσης του όξινου ορού γιαούρτης στις ανοσορυθμιστικές ιδιότητές του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο γενικής και ειδικής ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για τον σκοπό της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα όξινου ορού γιαούρτης από διάφορα είδη γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο) από βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων από το ηπειρωτικό τμήμα της Ελλάδας. Στη συνέχεια, τα δείγματα λυοφιλώθηκαν στον ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ και ακολούθησε η εκτίμηση της πρωτεΐνης με τη διαδικασία της μεθόδου Kjeldahl εκφρασμένη σε ποσοστό %. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα δείγματα διαλύθηκαν σε νερό και χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με βάση το πιο αραιό δείγμα ως προς την πρωτεΐνη, το οποίο υπολογίστηκε σε 0,9 %. Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα δείγματα της ζωικής προέλευσης του όξινου ορού καθώς και η πρωτεΐνοπεριεκτικότητά τους.



Εικόνα 2.1: Λυοφιλωμένος όξινος ορός γιαουρτιού.

Πίνακας 2.1: Δείγματα όξινου ορού καθώς και η πρωτεΐνοπεριεκτικότητά τους.










ΖΩΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΟΞΙΝΟΥ ΟΡΟΥ	ΠΡΩΤΕΪΝΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,279

ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,252
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,286
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,223
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,267
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,273
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,223
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,201
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,245
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,330
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,402
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,091
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,182
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,151
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,129
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,424
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,276
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,562
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,458
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΣ	0,179
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,713
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,355
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,352
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,534
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,239
ΑΙΓΕΙΟΣ	0,374
ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,358
ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,600
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,641
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	1,243
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,593
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,531
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	1,218
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,343
ΠΡΟΒΕΙΟΣ	0,590

2.1. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΕΨΗΣ *IN VITRO*

Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να παραχθούν τα τελικά προϊόντα γαστρεντερικής πέψης του όξινου ορού, από τα οποία θα αξιολογηθεί ο φυσιολογικός τους ρόλος στο λεπτό έντερο. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν αρχικά τα διαλύματα αλάτων, τα οποία αποτέλεσαν τη βάση για τα διαλύματα προσομοίωσης του σιελογόνου υγρού (Simulated Salivary Fluid, SSF), του γαστρικού υγρού (Simulated Gastric Fluid, SGF) και του εντερικού υγρού (Simulated Intestinal Fluid, SIF). Αυτά προστέθηκαν στη στοματική, γαστρική και εντερική φάση της πέψης αντίστοιχα, με ρύθμιση του pH και την επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία με σκοπό την προσομοίωση των κατάλληλων συνθηκών όμοιες με εκείνες που εμφανίζονται κατά την φυσιολογική πέψη ενός τροφίμου εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα. Πιο αναλυτικά, οι ποσότητες των ενζύμων (πεψίνη, παγκρεατίνη) και των χολικών αλάτων ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας με βάση των αριθμό των δειγμάτων προς πέψη και διαλύθηκαν ως εξής: η πεψίνη σε διάλυμα Tris (10 mM) και NaCl (150 mM) με pH =6,5 και η παγκρεατίνη και τα χολικά άλατα σε νερό Milli Q. Τα διαλύματα αλάτων (SSF, SGF, SIF) πριν την προσθήκη τους σε κάθε φάση προθερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37⁰ C.

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

-  Διαλύματα αλάτων SSF, SGF, SIF
-  Πεψίνη (Sigma- Aldrich, P7012)
-  Tris buffer 10 mM (Duchefa biochemie, T1501.1000)
-  Παγκρεατίνη χοίρου (Sigma- Aldrich, P3292)
-  Χολικά άλατα (bile extract porcine, Sigma- Aldrich, B8631)
-  Υδροχλωρικό οξύ (HCL) 5 mM
-  Καυστικό νάτριο (NaOH) 5 mM
-  Χλωριούχο νάτριο (NaCl) 5 mM (Sigma- Aldrich 746398- 500G)
-  Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂(H₂O)₂)

Εξοπλισμός:

- Σωλήνες falcon 50 mL
- Πιπέτες
- Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius TE214S)

- Συσκευή μέτρησης pH (BANTE Instruments 920)
- Υδατόλουτρο
- Επωαστικός κλίβανος (Mettler)
- Αναδευτήρες κυκλικής περιστροφής
- Φίλτρα (Millex, 0,22 μm)
- Φίλτρα (AMICON Ultra -4 Centrifugal Filters, 3KDa UFC801096).

ΣΤΟΜΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ (Oral phase)

- 1) Συγκεκριμένη ποσότητα όξινου ορού ενυδατώθηκε σε τελικό όγκο 5 ml και σε συγκέντρωση 0,9% πρωτεΐνη για όλα τα δείγματα, με σκοπό να είναι ισοσταθμισμένα ως προς αυτήν.
- 2) Στη συνέχεια, προστέθηκαν 4 ml/ δείγμα διαλύματος SSF και 25 μl άλατος χλωρίου ασβεστίου (CaCl_2 , 1,5 mM).
- 3) Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση του pH, καθώς και προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH , 5 M), προκειμένου να ρυθμιστεί το pH στο 7.
- 4) Το μείγμα συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τελικό όγκο τα 10 ml και επώαστηκε για 2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C υπό ανάδευση.

ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ (Gastric phase)

- 1) Στο ήδη υπάρχον μείγμα από την προηγούμενη φάση, προστέθηκαν 8 ml διαλύματος SGF, 1 ml πεψίνης και 5 μl άλατος χλωρίου ασβεστίου (CaCl_2 , 1,5 mM).
- 2) Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH και ακολούθησε προσθήκη ορισμένης ποσότητας HCl (5M) προκειμένου να αυξηθεί η οξύτητα, δηλαδή να γίνει το $\text{pH} = 3$.
- 3) Το μείγμα συμπληρώθηκε με νερό μέχρι τελικό όγκο 20 ml και επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C για 2 ώρες, υπό ανάδευση.

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ (Intestinal phase)

- 1) Μετά τις 2 ώρες, προστέθηκαν 4 ml διαλύματος SIF, 1,435 ml χολικά άλατα (10 mM), 20 μl CaCl_2 και 2,5 ml παγκρεατίνης.
- 2) Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μέτρηση pH για να ρυθμιστεί στο 7, με την προσθήκη διαλύματος NaOH .
- 3) Προστέθηκε νερό μέχρι τελικό όγκο 20 ml και το μείγμα επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C για 2 ώρες, υπό ανάδευση.

Ακολούθως, μετά την ολοκλήρωση της γαστρεντερικής πέψης, τα δείγματα υπέστησαν θερμικό σοκ στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 85⁰ C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1200g για 5 λεπτά και ύστερα περάστηκαν από 0,22 μm φίλτρο προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν βακτήρια ή άλλα υλικά. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πεπτιδίων με τη βοήθεια των φίλτρων τύπου Amicon. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 3 kDa (MWCO 3 kDa) για την απομάκρυνση πεπτιδίων υψηλού μοριακού βάρους. Τέλος, το διαπερατό κλάσμα που προέκυψε από την υπερδιήθηση, αποτελούμενο από πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους (χαμηλότερο των 3 kDa), καθώς επίσης και τα τελικά προϊόντα της γαστρεντερικής πέψης αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✚ Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (medium) RPMI 1640 (Biosera):
- ✚ 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum- FBS, gibco)
- ✚ 1% L- Γλουταμίνη (Sigma- Aldrich G7513, L- Glutamine)
- ✚ 1% Πενικιλίνη- Στρεπτομικίνη (Sigma- Aldrich P4333, Penicillin- Streptomycin)
- ✚ 1% Πυροσταφιλικό Νάτριο (Sodium Pyruvate, BioFroxx 1565ML)
- ✚ 1% Μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-Essential Amino Acids, NEAA, HIMEDIA ACL002)
- ✚ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma- Aldrich D2650)
- ✚ Trypan blue 0,2% (w/v) (Sigma- Aldrich T6146- 5G)
- ✚ PHospHate buffer saline (PBS, TAKARA)

Εξοπλισμός:

- Πιπέτες (10 mL)
- Υδατόλουτρο (37⁰ C)
- Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75, T175)
- Φυγόκεντρος (Hettich UNIVERSAL 2)
- Σωλήνες Falcons (15 mL)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)
- Φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials)

- Δοχείο ψύξης κυττάρων με υγρό άζωτο
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με καλυπτρίδα (Sigma- Aldrich, Z359629- 1EA)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου (20-200 μ L Nichipet EX 2J15409341)

Η καλλιέργεια των κυττάρων διεξήχθη σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow) σε ασηπτικές συνθήκες, με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η απόψυξη των κυτταρικών σειρών, οι οποίες ήταν αποθηκευμένες σε υγρό άζωτο (-196° C) μέσα σε κρυοφιαλίδια (cryovials). Τα κύτταρα αποψύχθηκαν στο υδατόλουτρο στους 37° C και έπειτα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου falcon μαζί με το θρεπτικό μέσο, όπου φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1500 στροφές, ώστε να απομακρυνθεί το κυτταροτοξικό διμέθυλο σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO), το οποίο περιέχεται στο διάλυμα κρυοσυντήρησης. Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε σε 10 mL θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μοιράστηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας, τα οποία τοποθετήθηκαν στον ειδικό θάλαμο επώασης σταθερής θερμοκρασίας στους 37° C και ατμόσφαιρας 5% CO_2 , όπου παρέμειναν για 24 ώρες και ακολούθως παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο η ανάπτυξη των κυττάρων και η πυκνότητά τους.

Τα κύτταρα της καλλιέργειας έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται στο εναιώρημα, δηλαδή να αυξάνεται η πυκνότητά τους. Συγκεκριμένα, όταν η πυκνότητα αυξηθεί κατά 50-60% πρέπει να γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (passaging/ subculturing) σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Σκοπός αυτού είναι η διατήρηση του βιολογικού υλικού που μελετάται, γιατί ειδάλως είναι δυνατό να επέλθει κυτταρικός θάνατος, εξαιτίας της συσσώρευσης των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων και της μείωσης της κυτταρικής δραστηριότητας λόγω περιορισμένου χώρου (Verhoeckx, 2015). Πιο αναλυτικά, οι ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνταν κάθε 24-48 ώρες. Αρχικά, τα κύτταρα συλλέχτηκαν σε σωληνάρια falcon των 15 mL και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1500 στροφές, ώστε να αποβάλλουν τα μεταβολικά προϊόντα και τις τοξίνες. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, ενώ το ίζημα των κυττάρων ανανεώθηκε με την προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού. Τέλος, τα κύτταρα με το θρεπτικό μέσο μεταφέρονταν κάθε φορά σε μεγαλύτερη φλάσκα καλλιέργειας, η οποία συμπληρωνόταν με επιπλέον ποσότητα RPMI 1640. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβανόταν έως ότου να υπάρχει επαρκής ποσότητα κυττάρων για την διεξαγωγή του πειράματος.

Μέτρηση κυττάρων και βιωσιμότητα τους

Για την μέτρηση των κυττάρων, αναμείχθηκε ορισμένη ποσότητα κυττάρων στο εναιώρημα με ισότονο διάλυμα trypan blue 1:1 και αραιώθηκε με PBS. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 10 μL του εναιωρήματος κυττάρων στην ειδική πλάκα μέτρησης Neubauer. Το αντιδραστήριο trypan blue εισχωρεί εύκολα στα νεκρά κύτταρα και τα χρωματίζει μπλέ (Verhoeckx, 2015), διακρίνοντας έτσι τα νεκρά κύτταρα από τα ζωντανά με πιο ευκρινή τρόπο κατά την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL υπολογίστηκε από τον τύπο: $M \times \Sigma \times 10^4$ **κύτταρα/mL**, όπου

Σ : συντελεστής αραιώσης.

M : ο μέσος αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

Βιωσιμότητα % = (ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων / ολικός αριθμός κυττάρων) * 100.

2.2.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ THP-1 ΣΕ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα έγινε με την προσθήκη διαλύματος pHorbol 12- myristate 13- acetate (PMA). Κατά την διάρκεια του πειράματος χρειάστηκε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες έκθεσης των κυττάρων στο PMA, που είναι απαραίτητες ώστε τα μονοκύτταρα να εμφανίσουν μια σωστή μορφολογική κατάσταση με έντονη προσκολλητική ικανότητα στο πιάτο καλλιέργειας και σε μεγάλο ποσοστό κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Έτσι, έγιναν διάφορες δοκιμές στην έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του PMA και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✚ PHorbol 12- myristate 13- acetate (PMA)
- ✚ Bacterial lipopolysaccharides (LPS) από Escherichia coli (TLR4 agonist) (Sigma, O111:B4) διαλυμένο σε 1X pHospHate- buffered saline (PBS)
- ✚ Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pHospHate buffer saline, TAKARA)

Εξοπλισμός:

- πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (12 well)
- Πιπέτες (5, 10, 25 mL)
- Σωλήνες falcons (50 mL)
- Οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUSCK2)

Πιο αναλυτικά, μεταφέρθηκαν σε σωλήνα falcon (50 mL) συγκεκριμένος όγκος του εναιωρήματος των κυττάρων, στα οποία έγινε πρώτα φυγοκέντρηση και ανανέωση με (10 mL) φρέσκο RPMI 1640 και αραιώθηκαν με RPMI 1640, ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι $1,2 \times 10^6$ κύτταρα/οπή σε πιάτο 12 οπών κυτταροκαλλιέργειας (Daigneault *et al.* 2010; Chanput, 2014). Προστέθηκαν 100 ng/ml PMA σε κάθε οπή με τελικό όγκο 1,5 mL. Κατόπιν, τα πιάτα καλλιέργειας επωάστηκαν για 48 ώρες και ύστερα έγινε παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Στο μικροσκόπιο, έγινε ορατή η διαφοροποίηση των κυττάρων λόγω της αλλαγής που υπέστησαν τα κύτταρα ως προς την μορφολογία τους καθώς και από την προσκόλλησή τους στον πυθμένα του πιάτου καλλιέργειας. Μετά τις 48 ώρες, το εναιώρημα απορρίφθηκε και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, προκειμένου να καθαριστούν τα κύτταρα. Έπειτα, προστέθηκε νέο RPMI στα κύτταρα και αυτά επωάστηκαν για 24 ώρες (rest phase-φάση «ξεκούρασης»).

2.2.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ (LPS)

Ο λιποπολυσακχαρίτης, που βρίσκεται στο εξωτερικό τοίχωμα του *Escherichia coli* (Gram – βακτήριο) έχει αποδειχτεί πως επηρεάζει σημαντικά τη φλεγμονώδη αντίδραση των κυττάρων όταν προσβάλλονται από βακτήρια. Όπως έχει αναφερθεί από τους Chanput *et al.*, 2010 και Bosshart & Heinzelmann, 2016, η έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών είναι μια τέτοια απόκριση. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα εκτέθηκαν στο LPS με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αυξημένη προσκολλητική και φαγοκυτταρική ικανότητα καθώς και αυξημένη έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως για παράδειγμα τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και κυτοκινών, καθώς και αυξημένη έκφραση γονιδίων, τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων (Chanput, 2012; Lund *et al.*, 2016). Έτσι, προκειμένου τα κύτταρα να μιμηθούν αυτή τη φλεγμονώδη κατάσταση, πραγματοποιήθηκε η έκθεση των διαφοροποιημένων μακροφάγων σε συγκέντρωση 100 ng/mL LPS και όξινο ορό για 24 ώρες μετά την φάση της «ξεκούρασης».

2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΟΞΙΝΟ ΟΡΟ

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας του όξινου ορού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του MTT (Microculture Tetrazolium Test). Η μέθοδος αυτή είναι μία χρωματομετρική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ή της βιωσιμότητας των κυττάρων. Απαιτεί μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια έτσι ώστε να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι εντός των κυττάρων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η μεγαλύτερη συγκέντρωση του προϊόντος πέψης του όξινου ορού, η οποία δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα, μετά από την έκθεσή τους σε αυτά.





Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκε το διάλυμα MTT, διαλύοντάς το σε διάλυμα PBS με τελική συγκέντρωση 5 mg/mL. Ταυτόχρονα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 θέσεων (80000 cells/100 μL) με θρεπτικό μέσο RPMI 1640 και FBS 10% (v/v) και επώαστηκαν για 48 ώρες, έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα με διάλυμα PBS και επώαστηκαν για 24 ώρες σε φρέσκο θρεπτικό μέσο (φάση ανάπαυσης). Μετά τις 24 ώρες το υπερκείμενο απορρίφθηκε και οι διάφορες θέσεις της πλάκας συμπληρώθηκαν με 2 mL μέσο καλλιέργειας που περιείχε 9000 μg πρωτεΐνη/ mL όξινο ορό. Μετά την παρέλευση των 3 ωρών, ο όξινος ορός μαζί με το RPMI απορρίφθηκαν και σε κάθε θέση της πλάκας προστέθηκε 0,5 mg/mL MTT. Ακολούθησε επώαση για άλλες 3 ώρες και στη συνέχεια έγινε παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο για το σχηματισμό των κρυστάλλων φορμαζίνης σε κάθε θέση της πλάκας, ως δείκτης ικανοποιητικής κατακρήμνισης του MTT από τα ζωντανά κύτταρα. Έπειτα, αφού αφαιρέθηκε το RPMI με το MTT, οι κρύσταλλοι διαλύθηκαν σε 100 μL DMSO, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιώδους χρώματος. Όσο το ιώδες χρώμα είναι πιο έντονο, τόσο μικρότερη είναι η κυτταροτοξικότητα της συγκέντρωσης του όξινου ορού. Τέλος, ακολούθησε η φωτομέτρηση της πλάκας σε μήκος κύματος 570 nm. Το DMSO χωρίς κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα χωρίς την προσθήκη όξινου ορού. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

Βιωσιμότητα% = $(\text{απορρόφηση δείγματος} - \text{απορρόφηση DMSO}) / (\text{απορρόφηση μάρτυρα} - \text{απορρόφηση DMSO}) \times 100$.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα έγινε χρήση του διαλύματος Nucleozol, το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικού γουανιδινίου που έχει την ικανότητα να διαλυτοποιεί το βιολογικό υλικό με αποτέλεσμα την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αφού διαλυθεί το βιολογικό υλικό, στη συνέχεια προστίθεται χλωροφόρμιο, το οποίο δημιουργεί τρεις φάσεις: α) την οργανική (organic pHase) κατά την οποία οι πρωτεΐνες απομονώνονται, β) την ενδιάμεση (inter pHase) κατά την οποία υπάρχει το DNA, γ) υδάτινη φάση (aqueous pHase) κατά την οποία υπάρχει το RNA το οποίο είναι διαλυμένο (Rio DC, 2010).

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

-  Nucleozol
-  Isopropanol (Sigma- Aldrich, 33539- 2.5 L)
-  80% αιθανόλη
-  Δις απεσταγμένο νερό (DEPC H₂O)

Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS)
- Πλαστικά φιαλίδια (1,5 mL, 0,5 mL, 0,2 mL)
- Μηχάνημα Vortex (Schientific Industries, Vortex genie 2)
- Nanodrop- UV- Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)

Πιο αναλυτικά, αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό RPMI 1640 από κάθε οπή του πιάτου καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS. Στα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί προστέθηκε 500 μ L Nucleozol, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια 1,5 mL. Ακολούθως, προστέθηκαν 200 μ L DEPC νερό σε κάθε δείγμα και αφού αναδεύτηκαν, επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 12000 g. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο πλαστικό φιαλίδιο 1,5 mL. Σε αυτό προστέθηκαν 300 μ L ισοπροπανόλης και αφού αναδεύτηκαν επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 12000 g. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα (RNA- pellet) ξεπλύθηκε με 500 μ L αιθανόλη 80% και φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 8000 g. Αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε με 25 μL DEPC νερό και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο θερμοπλοκ για 5 λεπτά στους 65°C και κατόπιν προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του RNA σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης RNA, μεταφέρεται στην συσκευή 1 μL από το δείγμα, η οποία μετρά την πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260, 280 nm. Έτσι, εμφανίζεται η συγκέντρωση του RNA καθώς και οι λόγοι 260/280 και 260/230. Ο δείκτης 260/280 πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,8-2,0 και ο δείκτης 260/230 μεταξύ 2,0- 2,2, προκειμένου ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων να θεωρείται καθαρό.

2.4 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA

Η DNase I είναι μία ενδονουκλεάση, η οποία έχει την ιδιότητα να διασπά το DNA και να απελευθερώνει ολιγονουκλεοτίδια δρώντας σε δίκλωνο και μονόκλωνο μόριο DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση σε συγκεκριμένες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας.

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✚ DNase I (RNase- free) (New England Biolabs, M0303L)
- ✚ DNase I Reaction buffer 10X (New England Biolabs, B0303S)
- ✚ Οξικό αμμώνιο
- ✚ Γλυκογόνο
- ✚ Αιθανόλη 100% (absolute)
- ✚ EDTA (0,5 M)
- ✚ Δις απεσταγμένο νερό (DEPC H_2O)

Εξοπλισμός:

- Μηχάνημα Vortex (Schientific Industries, Vortex genie 2)
- Πλαστικά φιαλίδια (0,5 mL)
- Φυγόκεντρος (Biofuge pico, Heraeus instruments)
- Φωτόμετρο μικροποσοτήτων- UV- Vis Spectrophotometer (Quawell, Q5000)

Αρχικά σε πλαστικά φιαλίδια (0,5 mL), προστέθηκαν 5000 ng RNA, 4 μL DNase I Reaction buffer, 1 μL DNase I και νερό DEPC μέχρι τελικό όγκο 40 μL . Στη συνέχεια, τα δείγματα στην

PCR στους 37⁰ C για 20 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκε 1 μL EDTA, το οποίο είναι μία χηλική ένωση που δεσμεύει τα μέταλλα και είναι απαραίτητη για τη δράση των νουκλεασών, προστατεύοντας το RNA. Μετά από αυτό, τα δείγματα επώαστηκαν ξανά στους 75⁰ C για 10 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 4 μL οξικό αμμώνιο, 1 μL γλυκογόνο και 100 μL αιθανόλη 100% και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80⁰ C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12000 g για 20 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα, το οποίο είναι RNA απαλλαγμένο από DNA διαλύθηκε σε DEPC νερό με ανάδευση σε vortex.

2.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Σε αυτή την τεχνική το ολικό RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσιδωτής αντίδρασης DNA (cDNA), δηλαδή το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) έχει την ικανότητα να καταλύει αυτή την αντίδραση. Το ένζυμο αυτό συντίθεται από ρετροϊούς. Οι τελευταίοι χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο ένζυμο έτσι ώστε να μπορούν να μετατρέπουν το γενετικό υλικό τους από μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA με αποτέλεσμα αυτό να έχει τη δυνατότητα να προσκολλάται στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών. Επιπλέον, εκτός από το ένζυμο χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Oligo dt και οι random 6 mers, οι οποίοι προσκολλώνται στο μόριο RNA και ενεργοποιούν το ένζυμο ώστε να τα επιμηκύνει επωάζοντάς τα στους 37⁰ C για 15 λεπτά στην PCR, ως επακόλουθο να παράγεται cDNA, συμπληρωματικό του αρχικού RNA. Μετά από αυτό το βήμα, ακολουθεί υψηλή θέρμανση στους 85⁰ C για 5 δευτερόλεπτα, προκειμένου να καταστραφεί η αντίστροφη μεταγραφάση και η αλυσίδα του RNA. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara BioInc.).

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✚ 5X PrimeScript Buffer (for Real Time)
- ✚ PrimeScript RT Enzyme Mix I
- ✚ Oligo dT Primer (50 μM)
- ✚ Random 6 mers (100 μM)
- ✚ RNase Free H₂O (Mili Q)

Εξοπλισμός:

- Πλαστικά φιαλίδια (0,2 mL & 1,5 mL)

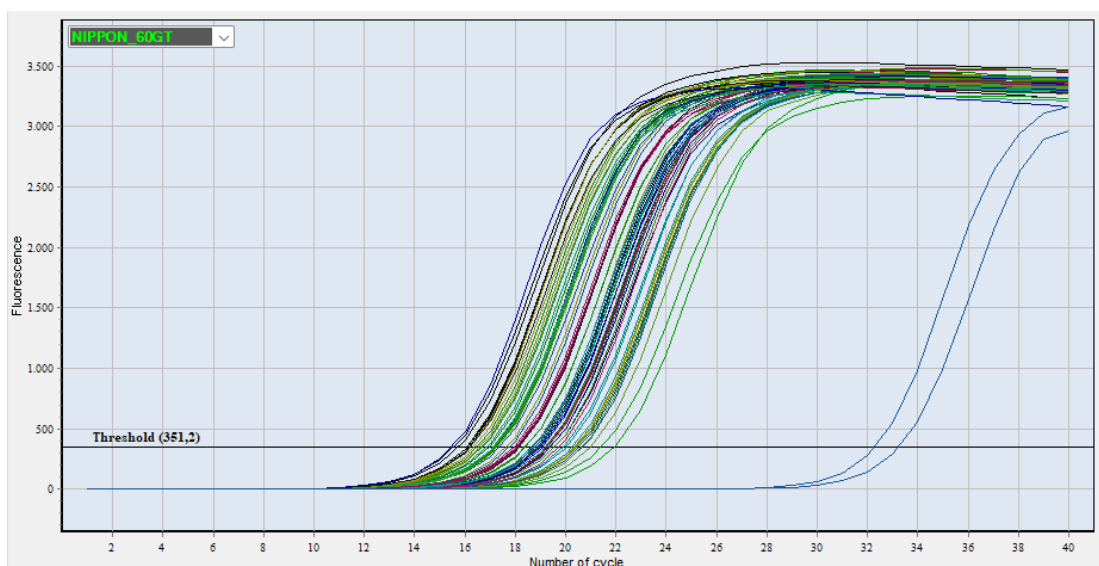
- Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκε, αρχικά, ένα μείγμα με τα παρακάτω αντιδραστήρια: 1) 5X PrimeScript Buffer (for Real Time): 2 μ L
2) PrimeScript RT Enzyme Mix I: 0,5 μ L
3) Oligo dT Primer (50 μ M): 0,5 μ L
4) Random 6 mers (100 μ M): 0,5 μ L

Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 ng από κάθε δείγμα στα φιαλίδια και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στην PCR, όπου επώαστηκαν σε συνθήκες: α) 37⁰ C για 15 λεπτά, κατά την οποία συμβαίνει η αντίστροφη μεταγραφή, όπως προαναφέρθηκε, β) 85⁰ C για 5 δευτερόλεπτα, όπου συμβαίνει η απενεργοποίηση του ενζύμου και αμέσως η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 4⁰ C, όπου ψύχεται το cDNA. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20⁰ C.

2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η PCR είναι μία μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση μορίων του DNA ή cDNA. Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλει στην δημιουργία πολλών επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής της αλληλουχίας DNA από μία DNA πολυμεράση. Αυτό έχει ως επακόλουθο την δημιουργία *in vitro* δισεκατομμυρίων αντιγράφων DNA. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής ο αριθμός των μορίων DNA αυξάνεται με εκθετική μορφή, διότι σε κάθε κύκλο αυτό διπλασιάζεται και όσο περνάει ο χρόνος φτάνει στο μέγιστο (Geoffrey M. Cooper, & Robert E. Hausman, 2013). Σε αυτή την μελέτη, για την έκφραση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ICGreen 2 x (Fast Gene ICGreen 2 x qPCR Universal Mix, NIPPON Genetics). Αυτή, παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα και αντίθετα όταν ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA, φθορίζει. Ο φθορισμός αυξάνεται αναλογικά, όταν αυξάνονται και τα προϊόντα της PCR. Αυτός, εντοπίζεται από το ειδικό σύστημα του θερμικού κυκλοποιητή, στον οποίο διενεργείται η αντίδραση και λαμβάνεται η τιμή Ct (Cycle threshold) για κάθε δείγμα. Η συγκεκριμένη τιμή, αντιστοιχεί στον κύκλο σύμφωνα με τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνάει το βασικό επίπεδο (baseline) και εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του DNA που υπάρχει στο δείγμα. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA στο δείγμα, τόσο πιο ταχύτερη θα είναι η ανίχνευση του φθορισμού, αποδίδοντας, έτσι, χαμηλότερες τιμές Ct (Bonad, 2015). Με τον όρο βασικό επίπεδο (baseline) νοείται το χαμηλού επιπέδου σήμα, το οποίο δημιουργείται κατά τους πρώτους κύκλους (3⁰-15⁰ κύκλο) της PCR, επειδή ο φθορισμός δεν υφίσταται σημαντικές

αλλαγές. Η οριζόντια γραμμή της γραφικής παράστασης απεικονίζει το «κατώφλι» (threshold) πάνω από το οποίο ο φθορισμός εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση συγκριτικά με το βασικό επίπεδο. Το σημείο τομής της καμπύλης κάθε δείγματος με το «κατώφλι», αντιστοιχεί στην τιμή Ct (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Γραφική παράσταση που απεικονίζει το σημείο «threshold».

Επίσης, για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (primers), προκειμένου να αρχίσει η αντίδραση και να οριοθετηθεί η επιθυμητή αλληλουχία του cDNA έτσι ώστε να πολλαπλασιαστεί. Ο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται συμπληρωματικά ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 3' της μίας αλυσίδας του γονιδίου- στόχου και ο άλλος ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου- στόχου, αντίστοιχα. Ως Forward Primer (F), χαρακτηρίζεται η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο 5' άκρο, ενώ ως Reverse Primer (R), η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο 3' άκρο. Για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας ($E = \text{efficiency}$) του κάθε εκκινητή πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της από την κλίση της πρότυπης καμπύλης (standard curve). Η σχέση μεταξύ μιας τυπικής κλίσης ($s = \text{slope}$) της καμπύλης και της απόδοσης είναι: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν αποδοτικότητα 90-110% και παρουσιάζονται στον πίνακα 2.5.1.

Πίνακας 2.5.1: Γονίδια και αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΕΜΠΡΟΣΘΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (F) 5'-3'	ΟΠΙΣΘΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (R) 5'-3'	ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)
B2M	GCTATCCAGCGTACTCCA	CTTAACTATCTTGGGCTGTGA C	103
HPRT1	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	CAAATCCAACAAAGTCTGGCT	106/99
RPS18	CTGAGGATGAGGTGGAACG	CAGTGGTCTTGGTGTGCT	98
RPL37A	AGTACACTTGCTCTTTCTGTGG	GGAAGTGGTATTGTACGTCCA G	106
TGFB	TGAACCCGTGTTGCTCTC	TAGTGAACCCGTTGATGTCC	94
COX2	CTCAGCCATACAGCAAATCCT	GGACTGTCAATCAAATGTGAT CTG	97
MMP9	ACAAGCTCTTCGGCTTCTG	ACAAACTGTATCCTTGGTCCG	90
LST1	CGGAATGATGTAAAGAGGCTG	AGGCATAGTCAGCTCTTGG	103
NFKB	GCACAAGGAGACATGAAACAG	CCCAGAGACCTCATAGTTGTC	97
IL6	GGATTCAATGAGGAGACTTGC	CATTTGTGGTTGGGTCAGG	95
IL1B	CAGATGAAGTGCTCCTTCCAG	CCTCGTTATCCCATGTGTCCG	99
TNFRSF1A	GTTCCACCTTCACCTCCAG	GGGTCATCAGTGTCTAGGC	99
ICAM	CAGACCTTTGTCCTGCCA	TCGTTGCCATAGGTGACTG	95
IL10	CATGCTTCGAGATCTCCGAG	AACCCAGGTAACCCTTAAAGT C	103
TLR2	ATCAGCAGGAACAGAGCACA	ACTCAGGAGCAGCAAGCAC	102
IRF5	GGAAATACACCGAAGGCGT	ATCCTCTGCAGCTCTCCT	108
MCP1	ATAGCAGCCACCTTCATCC	CAATGGTCTTGAAGATCACAG C	102
STAT2	CCATCAGCCAACTGAAAGAC	ATCCAGCACCTCCTTTCTC	104
MYD88	GACCAAATTTGCACTCAGCCT	AGACAGTGATGAACCTCAGG A	103
STAT1	TACACCTACGAACATGACCCT	ACCAACAGTCTCAACTCACA G	109
RELA	GGACTACGACCTGAATGCTG	ACCTCAATGTCCTCTTTCTGC	105
TNFA	TTCCTCAGCCTCTTCTCCT	GAGGGTTTGCTACAACATGG	100
TLR4	GATTTATCCAGGTGTGAAATCCAG	TAGAGATGCTAGATTTGTCTC CAC	105
IL8	GCTAAAGAACTTAGATGTCAGTGC	AACTTCTCCACAACCCTCTG	97

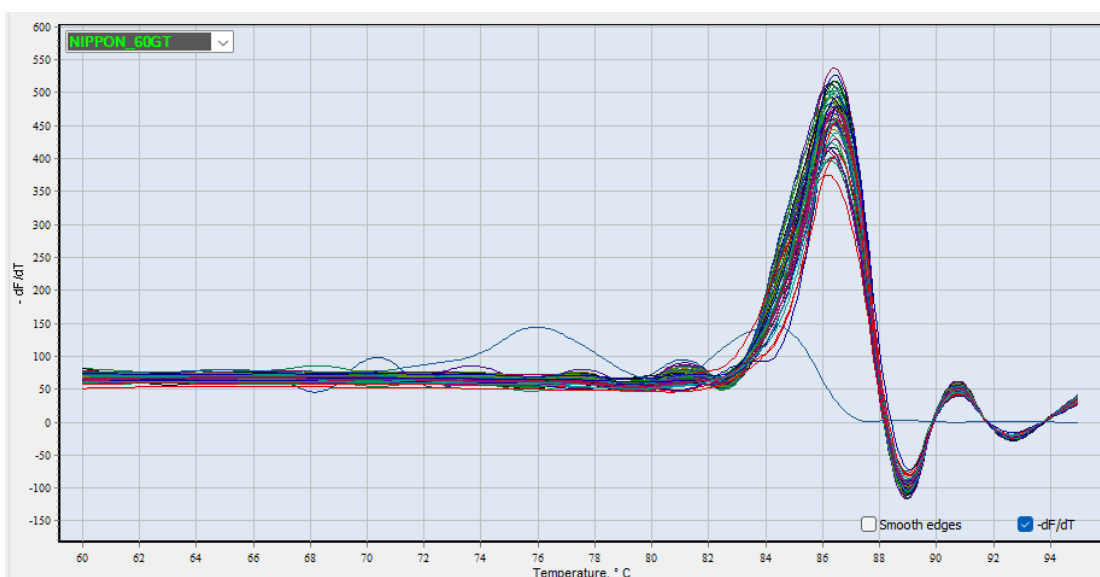
Τα γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν τα παρακάτω: Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας Βήτα (TGFB), Κυκλοοξυγενάση 2 (COX2), Μεταλλοπεπτιδάση μήτρας 9 (MMP9), Ειδικό μεταγράφημα λευκοκυττάρων 1 (LST1), Πυρηνικός παράγοντας Κάπα Βήτα (NFKB), Ιντερλευκίνη 6 (IL6), Ιντερλευκίνη 1 Βήτα

(IL1B), Μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης (ICAM), Ιντερλευκίνη (IL10), Υποδοχέας 2 (TLR2), Υποδοχέας 4 (TLR4), Ρυθμιστικός παράγοντας Ιντερφερόνης 5 (IRF5), Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFRSF1A), Μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 2 (STAT2), Μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 1 (STAT1), Πρωτο-ογκογόνο RELA (RELA), Παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFA), Ιντερλευκίνη 8 (IL8), χημειοκίνη 1- μεθυλοκυκλοπροπένιο (MCP1), πρωτεΐνη πρωτογενούς απόκρισης μυελοειδούς διαφοροποίησης (MYD88). Επιπλέον, επιλέχθηκαν ως γονίδια αναφοράς τα εξής: Βήτα-2-Μικροσφαιρίνη (B2M), Φωσφοριβοσυλτρανσφεράση υποξανθίνης 1 (HPRT1), Ριβοσωμική πρωτεΐνη S18 (RPS18) και Ριβοσωμική πρωτεΐνη L37A (RPL37A), ούτως ώστε να εξαλείψουν τυχόν διαφορές που υπάρχουν στα δείγματα, είτε εξαιτίας αποκλίσεων στην απόδοση της σύνθεσης του cDNA είτε λόγω μικρών διαφορών κατά την προσθήκη του γενετικού υλικού στην αντίδραση. Κατά την αντίδραση στην διάρκεια της ανάλυσης της PCR λαμβάνεται η καμπύλη αποδιάταξης (Melting curve) των μορίων DNA (Εικόνα 2.1). Η συγκεκριμένη καμπύλη αποτελεί τη γραφική παράσταση του φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας (°C), κατά την οποία διακρίνεται η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm) των προϊόντων από την ραγδαία μείωση του φθορισμού. Την ίδια στιγμή, λαμβάνεται και η γραφική παράσταση του αρνητικού λόγου της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας (-ΔF/ΔT) συναρτήσει με την θερμοκρασία (°C) (Εικόνα 2.3). Κάθε κορυφή της καμπύλης αντιστοιχεί σε ένα προϊόν της αντίδρασης. Ωστόσο, οι κορυφές, οι οποίες εμφανίζονται σε διαφορετική θερμοκρασία αποδιάταξης από αυτήν του γονιδίου- στόχου, δηλώνουν την παρουσία διμερών εκκινητών ή άλλων προϊόντων.

Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης της qRT-PCR μπορεί να γίνει μέσω της απόλυτης ή της σχετικής ποσοτικοποίησης. Στην παρούσα εργασία, σε όλες τις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν απαιτεί τη χρήση πρότυπης καμπύλης σε κάθε πλάκα για τον υπολογισμό των σχετικών αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης του στόχου και είναι πολύ χρήσιμη όταν υπάρχει περιορισμένη ποσότητα RNA. Ειδικότερα, υπολογίζεται η διαφορά των Ct του γονιδίου στόχου και γονιδίου αναφοράς για το δείγμα (ΔCt δείγματος) καθώς και η διαφορά γονιδίου στόχου και γονιδίου αναφοράς για το δείγμα “βαθμονομητή” (ΔCt control). Έπειτα, υπολογίστηκε το $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος - ΔCt βαθμονομητή και τέλος το μέγεθος το μέγεθος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ που

εκφράζει την ποσότητα του γονιδίου-στόχου αφού έχει πρώτα κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς και στη συνέχεια ως προς το βαθμονομητή



Εικόνα 2.3: Καμπύλη $-\Delta F/\Delta T$ προς T ($^{\circ}\text{C}$) F.

Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν:

- ✚ Eppendorf (0,2 mL & 0,5 mL)
- ✚ Πλάκες PCR 96 φρεατίων (Splash free support base SG 09 A5- 1A), ζελατίνες για τις πλάκες (Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) και εργαλείο επίστρωσης των ζελατινών (MicroAmp Adhesive Film Applicator, SG 13A7- 3B)

Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (HERAEUS Biofuge Stratos, Thermo Scientific)
- Real Time- PCR Systems 7500, Applied Biosystems

Πρώτα παρασκευάστηκε το μείγμα για κάθε είδος γονιδίου με τις κατάλληλες ποσότητες. Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας PCR προστέθηκαν 9 μL από το μείγμα και 1 μL από κάθε δείγμα του CDNA. Κάθε αντίδραση έγινε διπλή φορά, δηλαδή σε δύο φρεάτια της πλάκας. Ταυτόχρονα, για κάθε γονίδιο υπήρχαν και δύο τυφλά κελιά, τα Negative Control (N), τα οποία περιείχαν 9 μL από το μείγμα γονιδίου και 1 μL H_2O . Στη συνέχεια, η πλάκα καλύφθηκε με ειδική ζελατίνη, η οποία επιστρώθηκε στις άκρες με τη βοήθεια κατάλληλου εργαλείου και φυγοκεντρήθηκε

για 3-4 λεπτά, ώστε τυχόν σταγονίδια που έχουν προσκολληθεί στα τοιχώματα να καθιζάνουν. Τέλος, η πλάκα μεταφέρθηκε στην Real Time- PCR σε συγκεκριμένες συνθήκες θέρμανσης, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.5.2).

Πίνακας 2.5.2: Συνθήκες και στάδια Real Time PCR.

ΣΤΑΔΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική αποδιάταξη/ ενεργοποίηση	95	2 min	1
Αποδιάταξη	95	5 sec	40
Υβριδισμός και επιμήκυνση	60	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95	15 sec	1
	60	1 min	
	60 -95 °C /αυξάνεται ανά 0,3 °C/ ανά βήμα	15 sec ανά βήμα	

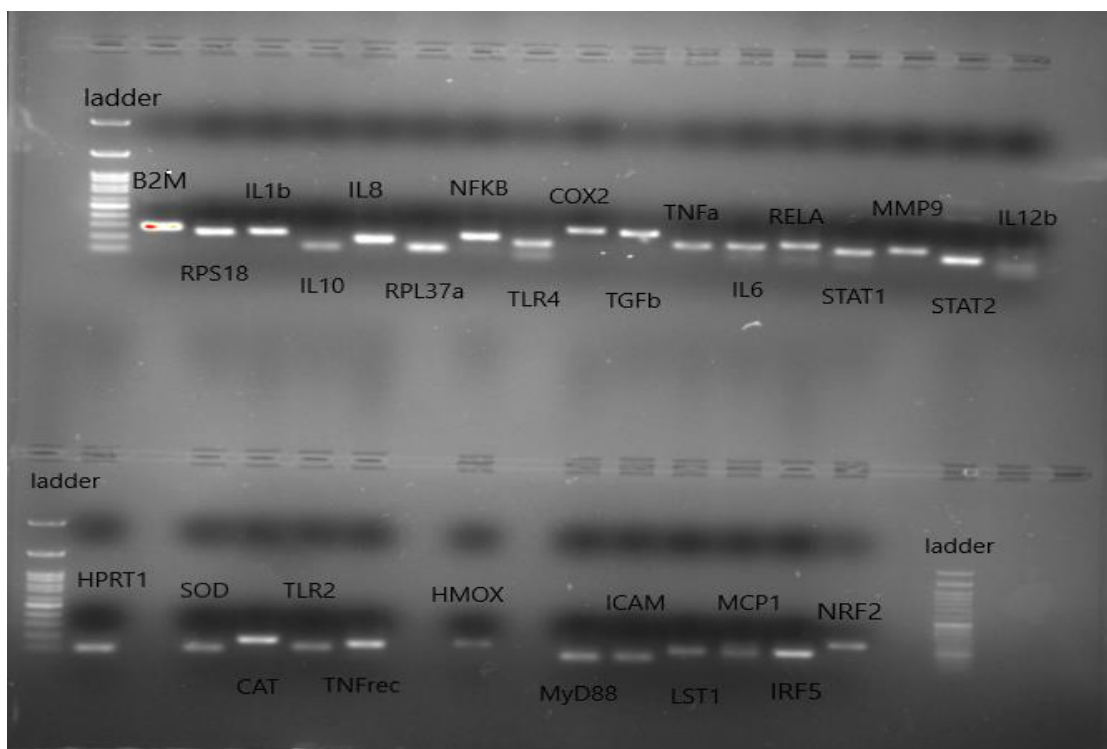
2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο σκοπός αυτής της μεθόδου είναι να διαχωρίσει, να ταυτοποιήσει και να απομονώσει μείγμα τμημάτων DNA ή RNA. Είναι γνωστό, ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, επειδή περιέχει φωσφορικές ομάδες. Επομένως, κατά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA μετακινούνται από το αρνητικό ηλεκτρόδιο προς το θετικό και η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους, δηλαδή τα μικρότερα μόριά του μετακινούνται με πιο γρήγορο ρυθμό σε σχέση με τα μεγαλύτερα με αποτέλεσμα να γίνεται ορατός ο διαχωρισμός μορίων σε διαφορετικά μήκη. Η χρήση της ηλεκτροφόρησης στη μελέτη, έγινε προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα της PCR, έτσι ώστε να επιβεβαιωθούν αν είναι τα αναμενόμενα μεγέθη με βάση τους primers που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της PCR. Στην εικόνα 2.3, απεικονίζονται οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με αυτούς τους primers καθώς και τα μεγέθη τους.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία για την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης ήταν η εξής:

- Αρχικά, έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε κωνική φιάλη, δηλαδή 1 gr αγαρόζης σε 100 mL διαλύματος 1X TAE (Tris- base, acetic acid, EDTA).
- Μετά, το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων, έτσι ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη.

- Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ βρωμιούχου εθιδίου (EtBr), όχι σε πολύ ζεστό διάλυμα.
- Κατόπιν, έγινε τοποθέτηση του διαλύματος στη συσκευή και όταν παγώσει το διάλυμα, με ειδική χτένα θα σχηματιστούν κάποια «δοντάκια», τα οποία αποτελούν τα πηγαδάκια, στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.
- Επίσης, όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα αγαρόζης, προστίθεται στη συσκευή και διάλυμα 1X TAE, ώστε να βυθιστεί το πήκτωμα και τότε βγάζουμε προσεκτικά την ειδική χτένα.
- Τέλος, στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί γίνεται φόρτωση των δειγμάτων με πιπέτα, αφού αναμιχθούν πρώτα με 4 μL χρωστικής. Στο πρώτο πηγαδάκι, φορτώνεται, συνήθως, ο μάρτυρας (ladder, New England Biolabs, NEB#B7025). Ο συγκεκριμένος, σχηματίζει κάποιες ζώνες, από τις οποίες ταυτοποιούνται τα μεγέθη των προϊόντων. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων, η συσκευή συνδέεται στο ρεύμα και αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση τα αποτελέσματα φωτογραφίζονται σε ειδικό μηχάνημα, το οποίο διαθέτει λαμπτήρα UV ακτινοβολίας (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.4: Πήκτωμα αγαρόζης κατά την παρατήρηση σε λαμπτήρα UV και απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης.

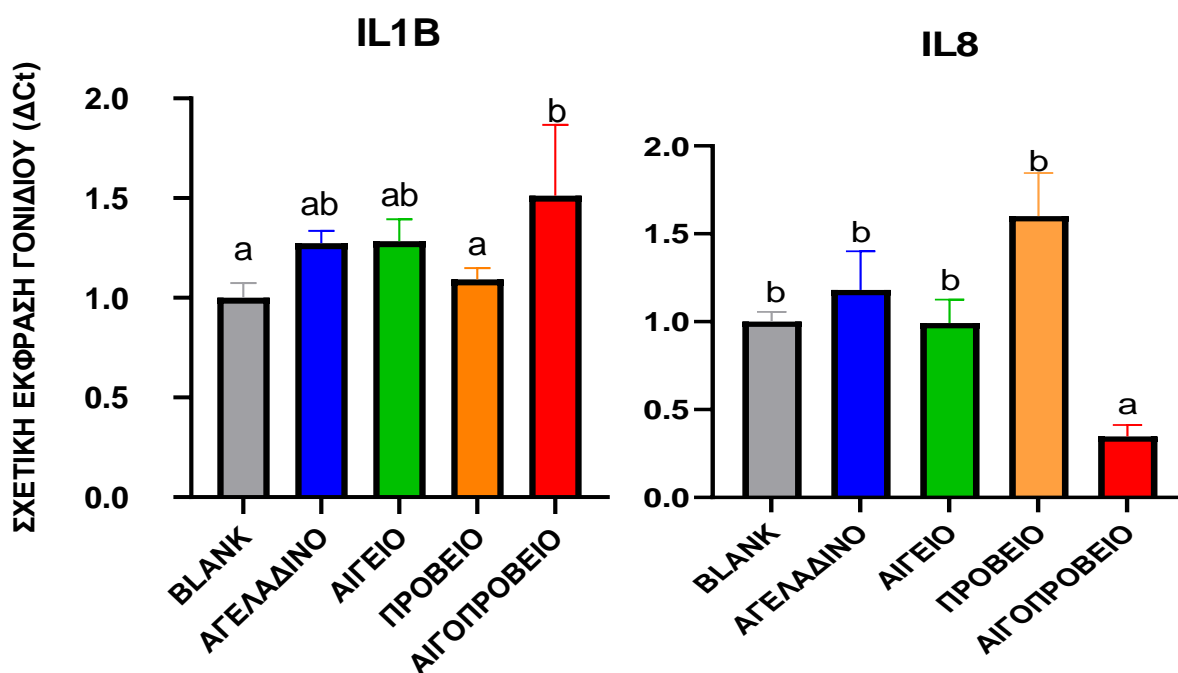
2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας έγινε με τη χρήση του IBM SPSS Statistics 2022. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε *One-Way ANOVA* και στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων/ επεμβάσεων αναλύθηκαν περαιτέρω και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το κριτήριο Tukey. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε κάτω από 0,05 ($p\text{-value} < 0,05$). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Graph Pad Prism 8 για την προσαρμογή των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ LPS ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

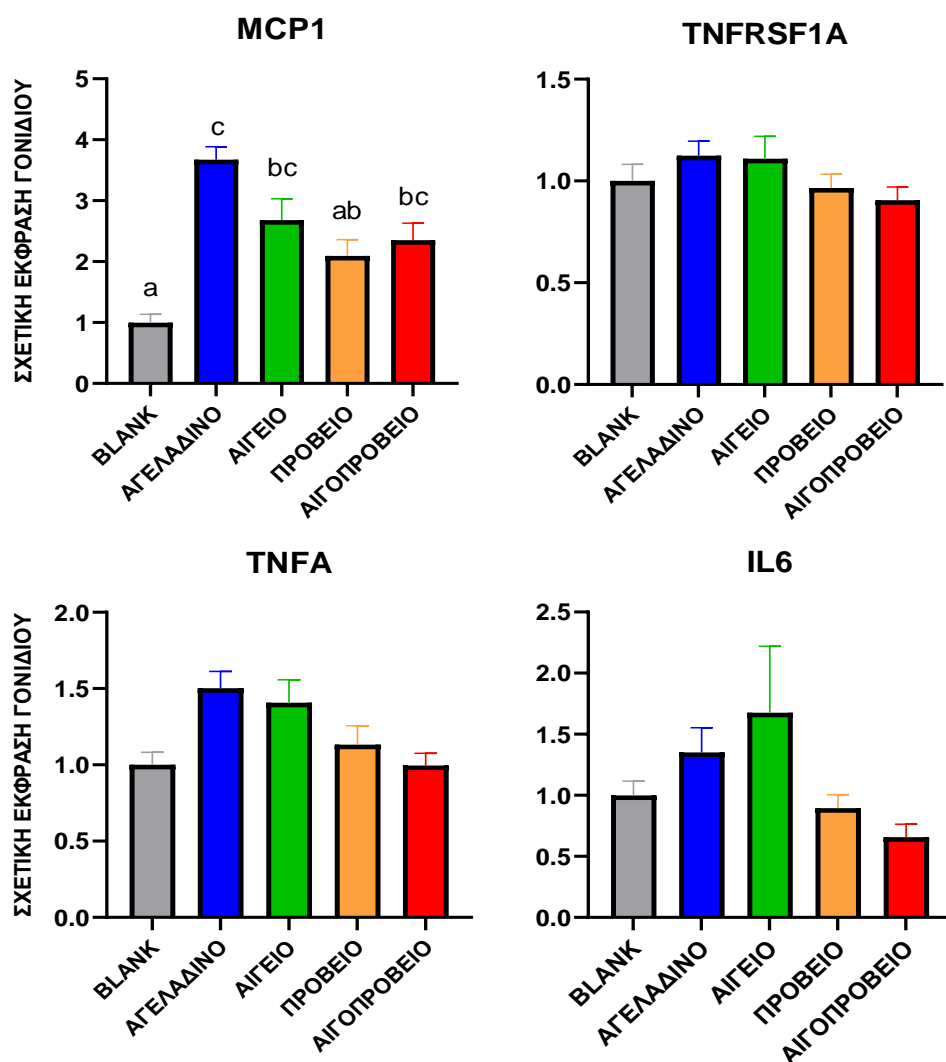
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα της σχετικής έκφρασης γονιδίων (άξονας Y) σε συνάρτηση με τα διάφορα είδη ζωικής προέλευσης του όξινο ορού γιαουρτιού (άξονας X). Στα ενεργοποιημένα μακροφάγα με LPS η γονιδιακή έκφραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL1B εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση ως προς την γονιδιακή έκφραση στον αιγοπρόβειο όξινο ορό σε σχέση με τον μάρτυρα (Blank), καθώς και με το πρόβειο, όπως διακρίνεται στο διάγραμμα 3.1. Αντίθετα, στην γονιδιακή έκφραση της IL8 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αιγοπρόβειο όξινο ορό συγκριτικά με τον μάρτυρα και τα υπόλοιπα είδη.



Διάγραμμα 3.1: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL1B και IL8 σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεση τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).

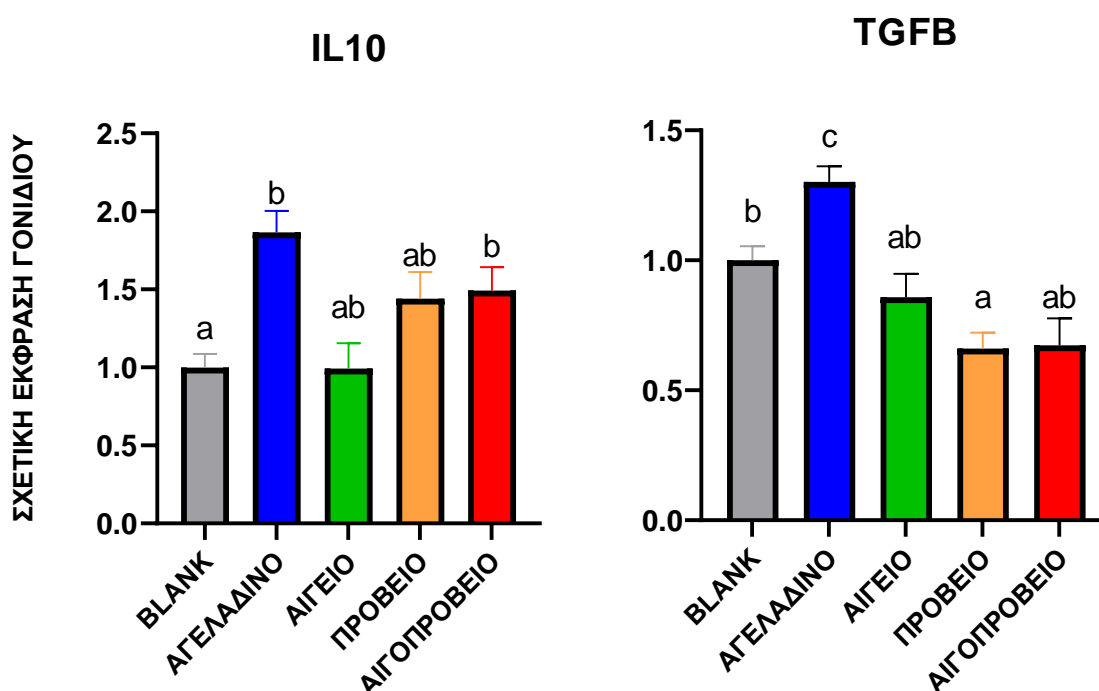
Στα ενεργοποιημένα μακροφάγα με LPS η γονιδιακή έκφραση της χημειοκίνης MCP1, εμφάνισε στατιστικώς σημαντική αύξηση ως προς την γονιδιακή έκφραση στον όξινο ορό της αγελαδινής, αίγιας και αιγοπρόβειας προέλευσης, όπου εκτέθηκαν τα μακροφάγα, σε σχέση με τον μάρτυρα (Blank). Επίσης, παρατηρήθηκε μεταξύ των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε

όξινο ορό πρόβειας και αγελαδινής προέλευσης μια στατιστικά σημαντική μείωση ως προς την αγελαδινή, με βάση το διάγραμμα 3.2. Επίσης, η έκφραση του TNFA, TNFRSF1A και IL6, όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 3.2. δεν εμφάνισε κάποια σημαντική διαφορά ως προς τον μάρτυρα ή ως προς τα υπόλοιπα είδη.



Διάγραμμα 3.2: Σχετική έκφραση των γονιδίων MCP1, TNFRSF1A, TNFA και IL6 σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεση τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).

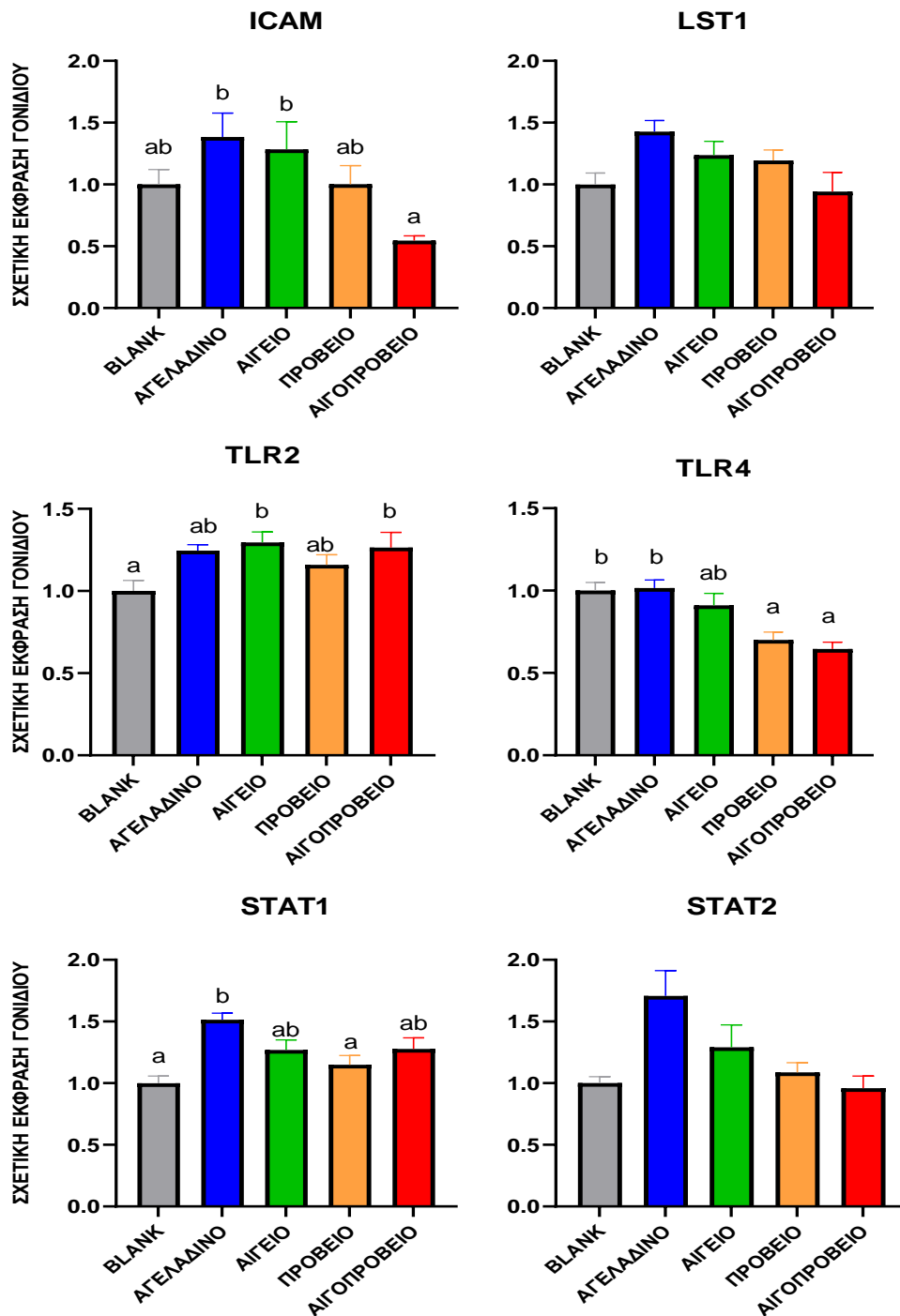
Η έκθεση των LPS ενεργοποιημένων μακροφάγων προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στη σχετική γονιδιακή έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL10 ως προς τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν στον αγελαδινό και αιγοπρόβειο όξινο ορό σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, από τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης του TGFB, παρατηρήθηκε ότι υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην γονιδιακή έκφραση στα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν στον αγελαδινό όξινο ορό συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ ταυτόχρονα υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στα κύτταρα που εκτέθηκαν στον πρόβειο ορό (διάγραμμα 3.3).



Διάγραμμα 3.3: Σχετική έκφραση των γονιδίων IL10 και TGFB σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Όσον αφορά την έκφραση του ICAM παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν στον όξινο ορό αιγοπρόβειας προέλευσης σε σύγκριση με την αγελαδινή και αίγεια προέλευση, όπως είναι ορατό στο διάγραμμα 4, ενώ σε σχέση με τον μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά. Επιπρόσθετα, στην έκφραση της του LST1 δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην περίπτωση του TLR2,

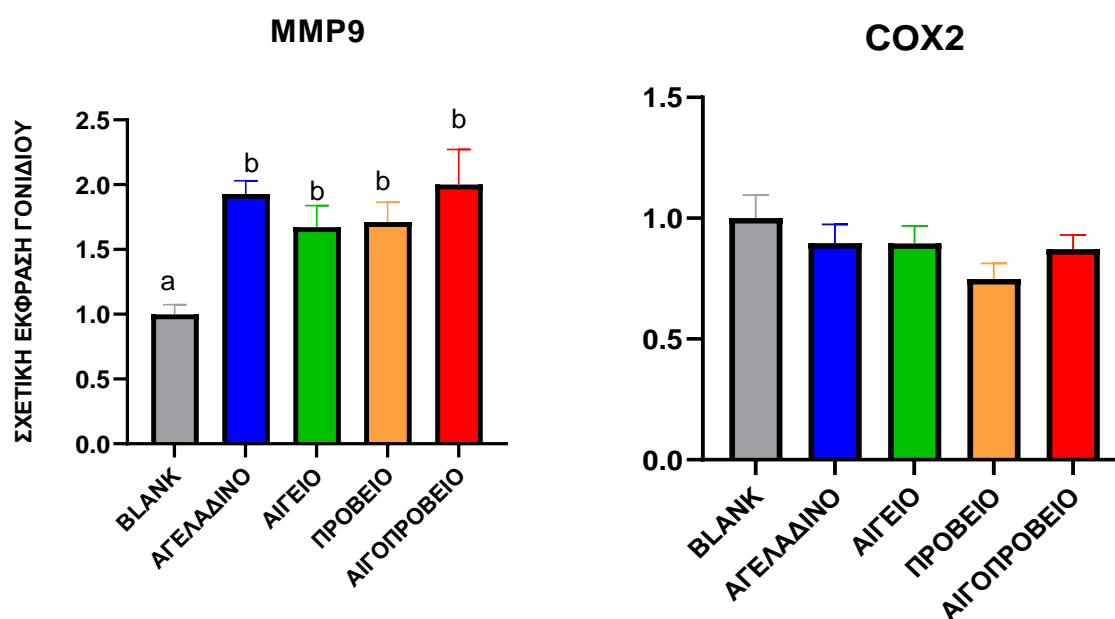
φαίνεται ότι υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση στον αίγιο και αιγοπρόβειο ορό, όπου εκτέθηκαν τα ενεργοποιημένα μακροφάγα σε σχέση με τον μάρτυρα, όσον αφορά την σχετική έκφραση του γονιδίου αυτού. Αντιθέτως, στην περίπτωση του TLR4, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ως προς την έκφραση του γονιδίου στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα, τα οποία έχουν εκτεθεί στον πρόβειο και αιγοπρόβειο όξινο ορό σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Επίσης, ως προς την σχετική γονιδιακή έκφραση το STAT1 εμφάνισε στατιστικώς σημαντική αύξηση στον αγελαδινό ορό όπου εκτέθηκαν τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συγκριτικά με τον μάρτυρα, ενώ στο STAT2 δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (διάγραμμα 3.4).



Διάγραμμα 3.4: Σχετική έκφραση των γονιδίων ICAM, LST1, TLR2, TLR4, STAT1 και STAT2 σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).

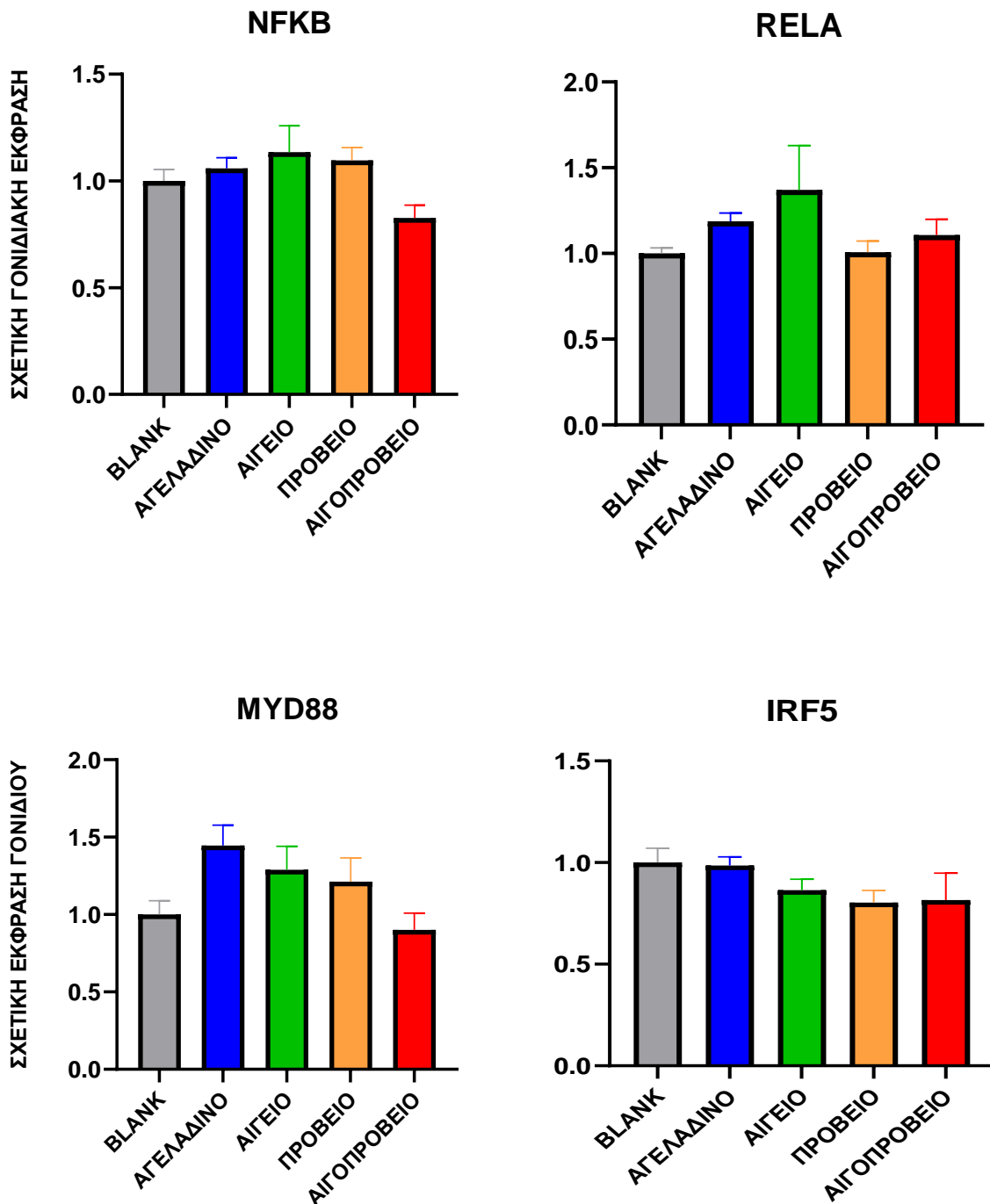
Η έκθεση των LPS ενεργοποιημένων μακροφάγων και στα τέσσερα είδη του όξινου ορού γιαουρτιού προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στη σχετική έκφραση του MMP9

συγκριτικά με τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που δεν εκτέθηκαν στον όξινο ορό (Blank). Αντιθέτως, στο COX2 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (διάγραμμα 3.5).



Διάγραμμα 3.5: Σχετική έκφραση των γονιδίων MMP9 και COX2 σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Τέλος, η σχετική έκφραση των γονιδίων NFKB, RELA, MYD88 και IRF5 δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά, έπειτα από την έκθεση των ενεργοποιημένων με LPS κυττάρων στα είδη όξινου ορού είτε συγκριτικά με τον μάρτυρα, είτε μεταξύ των δειγμάτων, όπως προκύπτει από το διάγραμμα 3.6.



Διάγραμμα 3.6: Σχετική έκφραση των γονιδίων *NFKB*, *RELA*, *MYD88* και *IRF5* σε LPS ενεργοποιημένα μακροφάγα έπειτα από την έκθεσή τους σε όξινο ορό γιαουρτιού διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM. Τα διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδηλώνουν ότι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($p < 0,05$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά THP-1, λόγω του ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως *in vitro* μοντέλα ανθρώπινων μονοκυττάρων και μακροφάγων σε μελέτες φλεγμονωδών ασθενειών (Chanput, 2014). Τα μονοκύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος διαφοροποιούνται σε μακροφάγα όταν υπάρχει φλεγμονή σε κάποιο σημείο. Για την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών αποκρίσεων των κυττάρων αυτών *in vitro* και την επαγωγή της έκφρασης φλεγμονωδών κυτοκινών, πραγματοποιείται διέγερσή τους με LPS. Οι Lu *et al.*, 2008 έχουν αναφέρει ότι με την έκθεση των κυττάρων στο LPS, το ανοσοποιητικό σύστημα το αναγνωρίζει μέσω του υποδοχέα TLR4, ο οποίος ενεργοποιεί τις αποκρίσεις άμυνας με ή χωρίς MYD88 ως προσαρμογέα σηματοδότησης. Το TLR4 που ενεργοποιείται από το LPS, ενεργοποιείται τελικά από τον NFκΒ, ο οποίος εξαρτάται από το MYD88, αυξάνοντας την μεταγραφική ικανότητα των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Στην συγκεκριμένη έρευνα, το TLR4 φάνηκε να μειώνει την σχετική έκφραση στην έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων στον πρόβειο και αιγοπρόβειο όξινο ορό συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε όξινο ορό (Blank) αλλά και με το αγελαδινό. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε στο TLR2 μια σχετική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου στον αίγιο και αιγοπρόβειο όξινο ορό, στα οποία εκτέθηκαν τα ενεργοποιημένα μακροφάγα σε σχέση με τον μάρτυρα. Η έκθεση των THP-1 στο LPS προκάλεσε την ενεργοποίηση και έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ, ο οποίος ενορχηστρώνει ένα πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που οδηγεί στην ενεργοποίηση της φλεγμονής και στον πολλαπλασιασμό των ανοσοϊκανών κυττάρων (Chanput *et al.*, 2014; Sharif *et al.*, 2007). Ωστόσο, στην παρούσα έρευνα το NFκΒ καθώς και το εξαρτώμενο γονίδιο MYD88, δεν εμφάνισαν καμία σημαντική διαφορά. Επομένως, ο όξινο ορός δεν φάνηκε να συμβάλλει στην περαιτέρω ενεργοποίηση του NFκΒ. Αυτοί οι υποδοχείς εκφράζονται στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων, των δενδριτικών και των λεμφοκυττάρων (Abreu, 2010; Michallet *et al.*, 2013).

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν, επίσης, ότι οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μπορούν να επηρεάσουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω των υποδοχέων TLR (Iskandar *et al.*, 2013). Με βάση τους Kiewet *et al.*, 2017, οι πρωτεΐνες και τα υδρολύματα ορού γάλακτος προκαλούν ενεργοποίηση του TLR. Στην συγκεκριμένη έρευνα, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά THP1, όπου η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος ενεργοποίησε την σηματοδότηση των TLR. Η πλειονότητα των αποκρίσεων στα THP1 κύτταρα που προκαλούνται από πρωτεΐνη ορού γάλακτος και τα υδρολύματά της είναι MYD88 και επομένως εξαρτάται από το TLR. Η

πρωτεΐνη του ορού γάλακτος προκάλεσε την ενεργοποίηση των TLR2 και TLR4, όμως οι διαφορές στις ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των υδρολυμάτων μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στις ιδότητες ενεργοποίησης του υποδοχέα TLR, καθώς ορισμένες μελέτες αναφέρουν μια αλληλεπίδραση μεταξύ των TLR, κυρίως στο TLR2 και TLR4 (Iskandar *et al.*, 2013; Ndiaye *et al.*, 2011).

Οι Chanput *et al.*, 2014 και Sharif *et al.*, 2007, απέδειξαν ότι τα κύτταρα THP-1, τα οποία εκτέθηκαν σε LPS και ενεργοποιήθηκαν για 1- 6 ώρες, παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή όπως: IL1B, IL6, IL8, IL10 και TNFA. Στην παρούσα μελέτη, η σχετική έκφραση της IL1B αυξήθηκε στα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν στον αιγοπρόβειο όξινο ορό σε σχέση με τον μάρτυρα όπως συνέβη και στην περίπτωση των Kiewet *et al.*, 2018, όπου η IL1B αυξήθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα μετά την χορήγηση υδρολυμάτων σόγιας, αλλά όχι μετά την προσθήκη υδρολύματος ορού γάλακτος.

Σε αντίθεση με την έκφραση στην IL8, κατά την οποία παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση στα ενεργοποιημένα με LPS κύτταρα που εκτέθηκαν στον αιγοπρόβειο όξινο ορό, ενώ στα υπόλοιπα είδη δεν υπήρξε σημαντική διαφορά. Πράγματι, όπως αναφέρουν σε έρευνα οι Kiewet *et al.*, 2018 οι οποίοι μελέτησαν τις επιδράσεις των επιθηλιακών και δενδριτικών κυττάρων, τα οποία εκτέθηκαν σε 2mg/ml υδρόλυμα σόγιας και ορού γάλακτος για 24 ώρες, παρατήρησαν ότι τόσο η υδρόλυση σόγιας όσο και του ορού γάλακτος προκάλεσαν παραγωγή των κυτοκινών IL8, TNFA, IL6 όταν βρίσκονται σε άμεση επαφή με διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα σε σύγκριση με μη διεγερμένα. Η υδρόλυση σόγιας επέφερε μόνο παραγωγή IL8 ενώ η υδρόλυση ορού γάλακτος, όχι. Επιπρόσθετα, οι Iskandar *et al.*, 2013 παρατήρησαν, επίσης, ότι η έκκριση της IL8 καταστέλλεται από την υδρόλυση πρωτεϊνών του ορού, ύστερα από διεγερση με LPS. Οι επιθηλιακές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποίησαν για την διεξαγωγή της έρευνας ήταν οι CFTE29ο και 1HAEο σε συνθήκες LPS (2,5 mg/mL) για 24 ώρες σε υδρολύματα πρωτεϊνών του ορού.

Αντιθέτως, η σχετική έκφραση των IL6, TNFA και NFkB δεν εμφάνισε κάποια σημαντική διαφορά, στην συγκεκριμένη μελέτη. Σε έρευνα των Kim *et al.*, 2019, οι οποίοι χρησιμοποίησαν προϊόν που έχει υποστεί ζύμωση σε διεγερμένα από LPS (100 ng/mL) κύτταρα RAW264.7 παρατηρήθηκε ότι αυτό κατέστειλε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων TNFA σε ποσοστό 80%, έναντι των επιπέδων που παρατηρούνται σε κύτταρα μόνο με χορήγηση LPS, ενώ στην παρούσα μελέτη το γονίδιο αυτό δεν απέδειξε κάποια σημαντική διαφορά.

Διαφορετική εικόνα παρουσίασε η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL10 καθώς η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε στα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν με LPS σε αγελαδινό καθώς και αιγοπρόβειο όξινο ορό γιαουρτιού σε σχέση με τον μάρτυρα (Blank). Πράγματι, σε έρευνα των Kiewet *et al.*, 2018 όπου αυξήθηκε η έκφραση της IL10 σε κύτταρα RAW264.7 που εκτέθηκαν σε LPS και στο προϊόν ζύμωσης. Όπως είναι αποδεδειγμένο σε διαφορετικά κύτταρα (επιθηλιακά και δενδριτικά), όταν αυτά εκτεθούν σε υδρόλυμα σόγιας και ορού γάλακτος σε συνθήκες 2mg/ml για 24 ώρες, προκαλούν την παραγωγή της IL10, όταν έρθουν σε άμεση επαφή με διεγερμένα δενδριτικά κύτταρα σε σχέση με μη διεγερμένα (Kiewet *et al.*, 2018).

Επίσης, όσον αφορά το γονίδιο MCP1 η σχετική έκφρασή του αυξήθηκε στα ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκτέθηκαν στα διαφορετικά είδη όξινου ορού, και ειδικά στα κύτταρα που εκτέθηκαν στον αγελαδινό όξινο ορό σε σύγκριση με τον μάρτυρα, του οποίου τα ενεργοποιημένα μακροφάγα δεν έχουν εκτεθεί σε όξινο ορό. Η παρατηρούμενη αύξηση της χημειοκίνης MCP1 υποδηλώνει ωρίμανση και ενεργοποίηση των διεγερμένων κυττάρων (Kranzer *et al.*, 2004; Ahonen *et al.*, 1999) που πυροδοτεί πιο έντονες αποκρίσεις στα Th17 και Th1 (Denning *et al.*, 2007; Mohamadzadeh *et al.*, 2005). Αυτές οι επιδράσεις, έχουν συνδεθεί με την ωρίμανση του Th2, νεογενικού ανοσοποιητικού συστήματος, προς την ανάπτυξη των αποκρίσεων Th1 και άρα σε μειωμένο κίνδυνο λοιμώξεων (Zaghouni *et al.*, 2009).

Επιπλέον, όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου ICAM στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων με LPS στον αιγοπρόβειο όξινο ορό μείωσαν την σχετική έκφρασή του, ωστόσο η έκθεσή τους στον αγελαδινό και αίγιο αύξησαν την σχετική έκφραση του γονιδίου. Σε έρευνα των Grancieri *et al.*, 2019, οι οποίοι μελέτησαν την πέψη της ολικής πρωτεΐνης από σπόρους Chia σε μακροφάγα κύτταρα Raw264,4 διεγερμένα με LPS (1μg/mL), διαπίστωσαν ότι υπήρξε μείωση στην σχετική έκφραση του γονιδίου, το οποίο συμφωνεί με την παρούσα μελέτη.

Η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων στον πρόβειο όξινο ορό μείωσε την σχετική έκφραση του γονιδίου TGFβ σε σχέση με τα κύτταρα που δεν εκτέθηκαν στον ορό. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα παραπάνω έρχεται η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων στον αγελαδινό όξινο ορό, ο οποίος αύξησε την έκφραση του γονιδίου. Σε πρόσφατη έρευνα από τους Massoti *et al.*, 2011, οι οποίοι χρησιμοποίησαν την κυτταρική σειρά U937, η οποία προκλήθηκε με 20 ng/mL TNFα είτε στο στάδιο των μονοκυττάρων είτε στο στάδιο των μακροφάγων και επώαστηκε για 48 ώρες, προκειμένου να εξετάσουν τις επιδράσεις τόσο της

σόγιας όσο και των γαλακτοκομικών ζυμώσεων στην παραγωγή TGFβ. Τα αποτελέσματά τους, αναφέρουν ότι οι ζυμώσεις του γάλακτος μείωσαν την παραγωγή του γονιδίου TGFβ στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα U937, αλλά όχι στα διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. Αντιθέτως, οι ζυμώσεις σόγιας δεν είχαν σημαντική επίδραση στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα U937, ενώ μείωσαν την παραγωγή TGFβ από τα διαφοροποιημένα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συγκρίνοντας, τα αποτελέσματα της μελέτης ως προς τη ζωική προέλευση του όξινου ορού γιαιουριού που μελετήθηκαν μετά την έκθεση των ενεργοποιημένων με LPS μακροφάγων στα διάφορα είδη σε σχέση με τον μάρτυρα (Blank), όπου τα ενεργοποιημένα μακροφάγα δεν έχουν εκτεθεί σε όξινο ορό, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Αρχικά, η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων στον αγελαδινό όξινο ορό φάνηκε να αυξάνει τη σχετική έκφραση των γονιδίων MCP1, IL10, TGFB, STAT1 και MMP9, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Επίσης, η έκθεση των κυττάρων στον αίγιο όξινο ορό αύξησε την έκφραση των γονιδίων MCP1, TLR2 και MMP9. Αντίθετα, η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων στον ορό πρόβειας προέλευσης επηρέασε τη σχετική έκφραση του γονιδίου MMP9 μόνο, ενώ παρουσίασε μείωση στη σχετική έκφραση των γονιδίων TGFB και TLR4. Μια διαφορετική εικόνα παρουσίασε η έκθεση των ενεργοποιημένων μακροφάγων με LPS στον αιγοπρόβιο όξινο ορό. Συγκεκριμένα, αυξήθηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων IL1B, MCP1, IL10, TLR2 και MMP9, ενώ παρουσίασε μείωση στην σχετική έκφραση των γονιδίων IL8 και TLR4, σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Συμπερασματικά, ο όξινο ορός μετά από έκθεση των μακροφάγων με LPS παρατηρήθηκε ότι έχει μια προφλεγμονώδη δράση, η οποία τεκμαίρεται από την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης διαφόρων προφλεγμονωδών γονιδίων. Υπάρχουν, ωστόσο, και σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών ζωικής προέλευσης, με πιο σημαντική διαφορά μεταξύ του IL1B και IL8 στον αιγοπρόβιο όξινο ορό. Οι Gauthier *et al.*, 2006; Madureira *et al.*, 2007; Gupta & Prakash, 2017 έχουν διαπιστώσει ότι η λακτοφερίνη των βοοειδών κατά την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνει την δραστηριότητα των μακροφάγων, προκαλώντας επαγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, δηλαδή της ιντερλευκίνης-8 (IL8), της ιντερλευκόνης-6 (IL6), της ιντερλευκίνης-1b (IL1b) καθώς και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFA), αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και ενεργοποιώντας τα μονοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα.

Επομένως, από τα αναφερθέντα είναι φανερό ότι υπάρχει μια διαφορετική απόκριση των κυττάρων σε κάθε είδος όξινου ορού, οι οποίες ωστόσο μπορεί να οφείλονται και σε άλλους παράγοντες που δεν έχουν διερευνηθεί στη παρούσα μελέτη. Επόμενος στόχος θα είναι να διερευνηθεί περαιτέρω, εκτός από την ζωική προέλευση του όξινου ορού, η επίδραση της τεχνολογικής επεξεργασίας (διαφορετικός τρόπος στράγγισης), η γεωγραφική προέλευση καθώς και η εποχικότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, A. K. Lichtman, AH. (2011). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia, Pa. London: Saunders Elsevier.
- Abreu, M. T. (2010). Toll- like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10 (2), 131-144.
- Ahonen, C.L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L.K., Lindh, J. M., Tomai, M.A., & Vasilakos, J.P. (1999). Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T- cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cellular Immunology*, 197 (1), 62-72.
- Blaschek K., Wendorff WL., Rankin S.A (2007). Survey of salty and sweet whey composition from various cheese plants in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90, (4), 2029-2034.
- Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M.J, Faas, M.M. (2004). ‘Gender difference in the non- specific and specific immune response in humans’, *American Journal of Reproductive Immunology*, 52(1), pp. 19-26.
- Bonab, M. M. (2015). “Real time PCR handbook, Lab Chip, 4(2), pp. 189-200.
- Bosshart, H. & Heinzelmann, M. (2016). “THP-1 cells as a model for human monocytes”. *Annals of Translational Medicine*, 4(21), pp. 4-7.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assuncao, R., Balance, S. (2019). “INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion”. *Nature Protocols*. 14(4): 1-24.
- Bruni, N., Capucchio, M., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., Corona, A., & Dosio, F. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin- related peptides and applications in human and veterinary medicine, *Molecules*, 21 (6), 752.
- Chadrapala J., Chen G.Q., Kezia K., Bowman E.G., Vasiljevic T., Kentish S.E (2016). Removal of lactate from acid whey using nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 177: 59-64.
- Chanfrau P.J.M., Nunez Perez J., Lara Fiallos M.V., Rivera Intriago L. M., Abril Porras V.H., Cuanan Guerrero M. J., Trujillo Toledo L. E. (2017). Milk Whey From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology. *La Prensa Medica Argentina*. 103 (4) 1-11.

- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A. (2006). “Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin- Technological implications for processing”, *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1229-1240.
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R.A., Savelkoul, H.F., Wichers, H.J. (2010). “Transcription profiles of LPS -stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food- derived compounds”. *Food and Function*, 1(3), pp. 254-261.
- Chanput, W. (2012). Immunomodulating effects of food compounds: a study using the THP-1 cell line. [dissertation]. Wageningen University, Wageningen, NL.
- Chanput, W., Mess, J.J., Savelkoula, H. F. J., & Wichers, H. J. (2013). ‘Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds’, *Food and Function*, 4(2), pp. 266-276.
- Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. (2014). “THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach’, *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37-45.
- Corrieu G. and Beal C. (2016). Yogurt: The Product and its Manufacture, In: *The Encyclopedia of Food and Health* Caballero, B., Finglas, P., and Toldra, F. (eds) vol 5, pp. 617-624. Oxford: Academic Press.
- Cross, M. L. & Gill, H. S. (2000). Immunomodulatory properties of milk’, *British Journal of Nutrition*, 84 (Suppl. 1), pp. 81-89.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H. M., Whyte, M.K.B., Dockrel, D. H. (2010). “The identification of markers of macrophage differentiation in PMA stimulated THP-1 cells and monocyte- derived macrophages”, *PLoS ONE*, 5(1).
- Dalbeth, N. Eric Gracey, Bregina Pool Karen Callon, Fiona M McQueen, Jillian Cornish, Alastair MacGibbon, Kate Palmano. (2010). ‘Identification of dairy fractions with anti-inflammatory properties in models of acute gout’, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(4), pp. 766-769.
- Da Silva, M. S., & Rudkowskaa, I. (2015). Dairy nutrients and their effect on inflammatory profile in molecular studies’, *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(7), pp. 1249-1263.
- Da Silva, M. S., Bigo C., Barbier, O., Rudkowskaa, I. (2017). ‘Whey protein hydrolysate and branched- chain amino acids downregulate inflammation- related genes in vascular endothelial cells’, *Nutrition Research*, 38, pp. 43-51.

- Delzer, G.C., McKenzie SW. Five-Day Biochemical Oxygen Demand. In: DN Myers; FD Wilde, (Eds), *National Field Manual for the collection of Water Quality Data*. Vol. 7.2, Techniques of Water- Resources Investigations Reports: U.S. Geological Survey; 1999.
- Denning, T.L., Wang, Y., Patel, S.R., Williams, I.R., Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17- producing T cell responses. *Nat. Immunol.* 8, 1086-1094.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y. & Saint- Sauveur, D. (2006). ‘Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins’, *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1315-1323.
- Geoffrey W. & Krissansen PHD (2007). Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications, *Journal of the American College of Nutrition*, 26:6, 713S-723S.
- Giansati, F., Panella, G., Leboffe, L., & Antonini, G. (2016). Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 9 (4), 61.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J., & Cross, M. L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (Suppl. 1), S111- S117.
- Giromini, C., Cheli, F., Rebutti, R., Baldi A. (2019). ‘Invited review: Dairy Proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier’, *Journal of Dairy Science*, 102(2), pp. 929-942.
- Grancieri, M., Martino, H. SD, & Gonzalez de Mejia, E. (2019). Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed total protein and protein fractions digests reduce biomarkers of inflammation and atherosclerosis in Macrophages in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63 (19).
- Gupta, C., & Prakash, D. (2017). Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages*. 2017; 3(3):31.
- Haque, E., Chand, R. & Kapila, S. (2009). ‘Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin’. *Food Reviews International*, 25(1), pp. 28-43.
- Iskandar, M. M., Dauletbaev, N., Kubow, S., Mawii, N., & Lands, L. C. (2013). Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)- stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to Toll- like receptor 4. *British Journal of Nutrition*, 110 (1), 58-68.

- Jacquot, A., Gauthier, S., Drouin, R., & Boutin, Y. (2010). Proliferative effect of synthetic peptides from b- lactoglobulin and a- lactoalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, 20, 514-521.
- Kanekanian A. (2014). *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, Cardiff Metropolitan University, UK, WILEY Blackwell.
- Kehagias C., Kalavritinos L., Triadopoulou C, (1992). Effect of pH on the yield and solids recovery of strained yoghurt from goat and cow milk. *Cultured dairy products journal*, August, 10-14.
- Ketterings, Q., K. Czymmek, S. Cmi, G. Godwin, and K. Ganoe. 2017. Guidelines for Land Application of Acid Whey. Accessed Feb. 23. 2017.
- Kiewiet, M. BG, Dekkers, R., Gros, M., van Neerven, R.J, Groeneveld, A., de Vos, P., & Faas, M. M. (2017). Toll- like receptor mediated activation is possibly involved in immunoregulating properties of cow's milk hydrolysates. *PLOS ONE*, 12 (6).
- Kiewiet, M. BG, Dekkers, R., Ulfman, L.H., Groeneveld, A., de Vos, P., & Faas, M. M. (2018). Immunomodulating protein aggregates in soy and whey hydrolysates and their resistance to digestion in an in vitro infant gastrointestinal model: new insights in the mechanism of immunomodulatory hydrolysates. *Food and Function*, 9 (1), 604-613.
- Kim, D.H., Chun, S.H., Oh, N.S., Lee, J. Y., & Lee, K.W. (2019). Antiinflammatory activities of Maillard reaction products from whey protein isolate fermented by *Lactobacillus gasseri* 4M13 in lippopolysaccharide- stimulated Raw 264.7 cells. *Journal of Dairy Science*, 102 (9), 7707-7716.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). 'Bioactive peptides: Production and functionality', *International Dairy Journal*, 16(9), pp. 945-960.
- Kranzer, K., Eckhardt, A., Aigner, M., Knoll, G., Deml, L., Speth, C., Lehn, N., Rehli, M., & Schneider- Brachert, W. (2004). Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 72 (8), 4416-4423.
- Kris- Etherton P., Hecker, K., Bonanome, A., Coval, S., Binkoski, A., Hilpert, K., Griel, A., & Etherton T. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 30, 71s-88s.
- Layman, D. K., B. Lonnerdal, and J. D. Fernstrom. 2018. Applications for a- lactalbumin in human nutrition. *Nutr. Rev.* 76:444-460.

- Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 62 2549-2559.
- Lund, M. E., Joyce T., Bronwyn, A., O' Brien, Donnelly, S. (2016). The choice of pHorbol 12- myristate 13- acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro- inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, Volume 430, Pages 64-70.
- Macwan S. R., Dabhi B. K., Parmar S.C., Aparnathi K.D. (2016). Whey and its Utilization *International Journal of current Microbiology and Applied Sciences* vol. 5(8): p. 134-155.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X., (2007). "Bovine Whey Proteins – Overview on their main biological properties". *Food Research International*, Volume 40, Issue 10, Pages 1197- 1211, ISSN 0963- 9969.
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., Sarkar, P. (2018). *Bioactive peptides from whey proteins, Whey Proteins: From Milk to Medicine*.
- Masotti, A. I., Buckley, N., Champagne, C. P., & Green- Johnson, J. (2011b). Immunomodulatory bioactivity of soy and milk ferments on monocyte and macrophage models. *Food Research International*, 44 (8), 2475-2481.
- Michallet, M. C., Rota, G., Maslowski, K., & Guarda, G. (2013). Innate receptors for adaptive immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 16 (3), 296-302.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W., Ruthel, G. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2880-2885.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. S. (2016). 'Milk derived from bioactive peptides and their impact on human health- A review', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), pp. 577-583.
- Mercier, A., Gauthier, S. F. & Fliss, I. (2004). Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*, 14, 175-183.
- Millan- Linares, M. del C., Bermudez B., Yust M. del M., Millan F., Pedroche J. (2014). 'Anti- inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1 derived macrophages', *Journal of Functional Foods*, 8(1), pp. 224-233.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P. (2014). "A standardized static in vitro digestion method suitable for food an international consensus". *Food and Function*, 5(6), pp. 1113-1124.

- Moschopoulou E. & Moatsou G. (2017) Greek Dairy Products: In: “*Mediterranean Food: Composition and Processing*”. Rui Cruz & Margarida Vieira (Eds) CRC Press (Eds), Boca Raton, Florida, USA. pp. 267-320.
- Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R.E., & Matar, C. (2011). Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *European Journal of Nutrition*, 51 (1), 29- 37.
- Nongonierma, A. B. & FitzGerald, R.J (2015). The scientific evidence for the role of milk protein- derived bioactive peptides in humans: A review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640-656.
- Okabe, Y. & Medzihtov, R. (2014). ‘Tissue- specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages’, *Cell*, 157(4), pp.832-844.
- Ozer B. (2006). Production of Concentrated Products, In: *Fermented Milks*, Tamime A.Y. Ed. Blackwell Science.
- Park, Y.W., & Nam, M.S (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (6), 831- 840.
- Pihlanto, A. (2011). Bioactive Peptides, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland.
- Piccolomini, A. F., Iskandar, M. M., Lands, L. C., Kubow, S. (2012). “High hydrostatic pressure pre- treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells”, 6628.
- Radford- Smith, G. & Jewell D.P. (1994). The role of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation*, vol. 3, Article ID 25431, 7 pages.
- Rammer, P., L. Groth- Pedersen, T. Kirkegaard, M. Daugaard, A. Rytter, P. Szyniarowski, M. Hoyer -Hansen, L. K. Povlsen, J. Nylandsted, J. E. Larsen, and M. Jaattela. 2010. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* 9:24-32.
- Robinson R.K., Lucey J.A., Tamime A.Y (2006). Manufacture of Yogurt, In: *Fermented Milks*, Tamime A.Y. Ed. Blackwell Science.
- Silva, S. V., & Malcata, F.X (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15 (1), 1-15.
- Schlimme, E. and Meisel, H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* 39, 1-20.
- Tamime A.Y., Robinson R. K. (1999). *Yogurt Science and Technology*, Woodhead Publishing, second edition.

- Tamime A.Y., Hickey M., Muir D.D (2014). Strained fermented milks – A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. *International Journal of Dairy Technology*, Volume 67 No 3 p. 305-333.
- Theodorou, G. & Politis, I. (2016). Effects of peptides derived from traditional Greek yoghurt on expression of pro- and anti- inflammatory genes by ovine monocytes and neutrophils, *Food and Agricultural Immunology*, 27:4, 484-495.
- Thivend P. (1978). Use of whey in feeding ruminants. *Ruminant Nutrition: Selected Articles from the World Animal Review*, FAO, Italy
- Tsakali E., Petrotos K., Alessandro A., Goulas P. (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In: 6th International conference on simulation and modelling in the food and bio-industry FOODSIM 2010, CIMO Research Centre, Braganca, Portugal, 24-26 June.
- Uduwerella G., Chandrapala J., Vasiljevic T. (2018). Reconcentration of yoghurt base by ultrafiltration for reduction in acid whey generation during Greek yoghurt manufacturing. *International Journal of Dairy Technology* Vol 71, No.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., Exposito, I.L. Kleiveland, C. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*.
- Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J., (2006). *Dairy Science and Technology* Second Edition by Taylor & Francis Group, LLC.
- Zaghouni, H., Hoeman, C.M., Adkins, B. (2009). Neonatal immunity: faulty T- helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* 30, 585-591.
- Καμιναρίδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009). *Γαλακτοκομία*, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Καρασταμάτης, Σ., (2019). Παρασκευή στραγγιστού γιαουρτιού: Επίδραση διαφόρων τεχνολογικών παραμέτρων στα χαρακτηριστικά του προϊόντος και στη σύσταση του παραγόμενου ορού. Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κουτελιδάκης, Α. (2015). Βιοδραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων. Στο Κουτελιδάκης, Α. Λειτουργικά Τρόφιμα: Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Κεφ. 3.
- ΦΕΚ 2457/2016. Αντικατάσταση του άρθρου 82 «Γιαούρτι» του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) (ΦΕΚ 788/ Β’/31.12.1987).