



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

Διδακτορική διατριβή

Αξιολόγηση ανοσορυθμιστικών, αντιυπερτασικών και αντιοξειδωτικών
ιδιοτήτων γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Ελένη Δ. Νταλάκα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ιωάννης Πολίτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ιωάννης Μπόσης, Καθηγητής ΑΠΘ



ΑΘΗΝΑ, 2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Αξιολόγηση ανοσορυθμιστικών, αντιυπερτασικών και αντιοξειδωτικών
ιδιοτήτων γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Evaluation of immunoregulatory, antihypertensive and antioxidant
properties of dairy by-products

Ελένη Δ. Νταλάκα

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος Θεοδώρου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ιωάννης Πολίτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ιωάννης Μπόσης, Καθηγητής ΑΠΘ

Μοάτσου Γκόλφω, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μοσχοπούλου Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μαυρικού Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Κατσαρός Γεώργιος, Ερευνητής Γ'ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αξιολόγηση ανοσορυθμιστικών, αντιυπερτασικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η συλλογή και επεξεργασία όλων εκείνων των δεδομένων που συντελούν στην εύρεση βιολειτουργικών ιδιοτήτων γαλακτοκομικών υποπροϊόντων με έμφαση στις ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του τυρογάλακτος και του όξινου ορού γιαούρτης (ΟΟΓ). Το τυρόγαλα είναι υποπροϊόν της τυροκόμησης, ενώ ο ΟΟΓ προέρχεται κατά την παρασκευή στραγγιστής γιαούρτης. Οι σημαντικότερες διαφορές τους είναι ότι ο ΟΟΓ έχει χαμηλότερο pH και μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε σχέση με το τυρόγαλα. Η ραγδαία αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, η ανάγκη του ανθρώπου για στροφή σε λειτουργικά τρόφιμα σε συνδυασμό με την εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας οδήγησε στην έρευνα για την αξιοποίηση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, συμπεριλαμβανομένου του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ. Η συνεχής αύξηση της παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων οδηγεί σε τεράστιες ποσότητες υποπροϊόντων, για αυτό κρίνεται επιτακτική ανάγκη της αξιοποίησής τους με νέους τρόπους για την παραγωγή καινοτόμων προϊόντων με ποικίλες εφαρμογές

Αρχικά, συλλέχθηκαν γαλακτοκομικά υποπροϊόντα από αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο και αιγοπρόβειο (μόνο για το τυρόγαλα) γάλα από διάφορες βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων και μικρά τυροκομεία της ηπειρωτικής Ελλάδας κατά τη διάρκεια του έτους. Ακολούθησε λυοφιλίωση των δειγμάτων και *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης με ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στατικό μοντέλο. Έπειτα έγινε χρήση μεμβρανών διήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 10 kDa και 3 kDa για το διαχωρισμό των πεπτιδίων.

Για τη μελέτη των ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων (πρώτο μέρος της πειραματικής μελέτης) χρησιμοποιήθηκαν η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκύτταρων/μακροφάγων THP-1 (με και χωρίς πρόκληση LPS) και η κυτταρική σειρά μακροφάγων μύος RAW 264.7 (μόνο με πρόκληση LPS). Για τη διερεύνηση της ανοσιακής ρύθμισης, μελετήθηκε η επίδραση του κλάσματος της πέψης αποτελούμενο από πεπτιδία μοριακού βάρους <3 kDa (D-P3) στη γονιδιακή έκφραση κυτοκινών, μεταγραφικών παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανοσιακή απόκριση καθώς και η αναστολή παραγωγής του νιτρικού οξέος (NO). Παρατηρήθηκαν αρκετές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και ενδεικτικά αναφέρονται μερικές από αυτές. Εντοπίστηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA των *IL1B* και *ICAM1* σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε πρόβειο και αιγοπρόβειο τυρόγαλα και μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA των *IL6* και *TLR4* μόνο για το πρόβειο τυρόγαλα. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής έκφρασης *CXCL8* για αγελαδινό, πρόβειο και αιγοπρόβειο τυρόγαλα σε σχέση με το BL-D-P3. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA του *STAT2*, *NFE2L2*, *HMOX*, *SOD* και *CAT* στα THP-1 κύτταρα που εκτέθηκαν σε τυρόγαλα σε σχέση με τα BL-D-P3. Μετά την έκθεση των κυττάρων σε LPS, εντοπίστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των *CXCL8* και *CAT* για το τυρόγαλα ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο BL-D-P3, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του *IRF5*. Τα επίπεδα *TNF* και *STAT1* ήταν στατιστικώς υψηλά μόνο για το πρόβειο τυρόγαλα και η γονιδιακή

έκφραση των *ICAM1*, *STAT2*, *MYD88* και *HMOX1* σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε αγελαδινό τυρόγαλα. Περαιτέρω, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των *IL1B*, *TGFB*, *LST1*, *NFKB1*, *STAT2*, *MYD88*, *CXCL8* και *TLR2* στα THP-1 μακροφάγα που εκτέθηκαν σε πρόβειο ΟΟΓ. Μετά την έκθεση των κυττάρων σε LPS, εντοπίστηκε μείωση των *TLR4* και *IRF5* για τον πρόβειο ΟΟΓ, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του *IL10* και *STAT1* για αγελαδινό και αίγιο ΟΟΓ. Αναφορικά με το αντιφλεγμονώδες δυναμικό που μελετήθηκε σε RAW 264.7 ενεργοποιημένα κύτταρα παρουσία D-P3 τυρογάλακτος παρουσιάστηκε μείωση της γονιδιακής έκφρασης του *Nos2* για το αίγιο και πρόβειο τυρόγαλα σε σύγκριση με το BL-D-P3. Η μείωση αυτή μεταφράστηκε σε μείωση παραγωγής NO μόνο στο πρόβειο τυρόγαλα. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή NO για το πρόβειο και αίγιο ΟΟΓ τόσο με το BL-D-P3 όσο και με το αγελαδινό ΟΟΓ, χωρίς ωστόσο να υπάρχει ανάλογη μείωση των επιπέδων mRNA του *Nos2*.

Για τη μελέτη των αντιυπερτασικών ιδιοτήτων (δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας), προσδιορίστηκε η ACE ανασταλτική δράση του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ, πριν και μετά την *in vitro* πέψη για το κλάσμα D-P3 και το κλάσμα της πέψης αποτελούμενο από πεπτίδια μοριακού βάρους <10 kDa (D-P10), καθώς έχει αναφερθεί πως η αντιυπερτασική δράση συνδέεται με τα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια που προκύπτουν από τη γαστρεντερική πέψη. Η αναστολή του ACE μετά την *in vitro* πέψη ήταν σημαντικά υψηλότερη τόσο για το D-P10 όσο και για το D-P3 σε σύγκριση με τα αρχικά γαλακτοκομικά υποπροϊόντα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αυξημένη ανασταλτική δράση του ACE στο πρόβειο τυρόγαλα για D-P10 και D-P3 σε σχέση με το αίγιο και αγελαδινό. Τα δείγματα τυρογάλακτος που συλλέχθηκαν από τη Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία είχαν καλύτερη αντιυπερτασική δράση για τα D-P3 σε σύγκριση με τις άλλες περιφέρειες. Ο παράγοντας της εποχικότητας δεν επηρέασε την ανασταλτική δράση του ACE για το τυρόγαλα, ενώ για τον ΟΟΓ παρατηρήθηκε βελτίωση της δράσης αυτής μετά την *in vitro* πέψη, για το κλάσμα D-P10, στα δείγματα που συλλέχθηκαν τους καλοκαιρινούς μήνες.

Για τη μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (τρίτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας), προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων με τις βιοχημικές μεθόδους ORAC, ABTS, FRAP και P-FRAP πριν και μετά την *in vitro* πέψη καθώς και του κλάσματος D-P3. Συνολικά, μετά την *in vitro* πέψη παρατηρήθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 3-10 φορές, ανάλογα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε. Εντοπίστηκε αύξηση πριν την πέψη, με τη μέθοδο ORAC για το αγελαδινό τυρόγαλα, με αυτήν τη διαφορά να απουσιάζει μετά την πέψη. Αντιθέτως, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε στο πρόβειο τυρόγαλα σε σχέση με το αγελαδινό με τη μέθοδο ABTS πριν και μετά την πέψη. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική δράση για τον πρόβειο ΟΟΓ μετά την πέψη με τη μέθοδο ORAC. Με την ίδια μέθοδο, εντοπίστηκαν διαφορές για το κλάσμα D-P3 ως προς την εποχικότητα, με τα καλοκαιρινά να εμφανίζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, τα δείγματα που συλλέχθηκαν από την Πελοπόννησο και τη Στερεά Ελλάδα έδειξαν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση πριν την πέψη με την ABTS μέθοδο. Τέλος, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του D-P3 σε κυτταρικό επίπεδο με τη χρήση της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς του παχέος εντέρου HT-29 παρουσία H₂O₂. Παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή των ROS για το πρόβειο τυρόγαλα σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε H₂O₂, καθώς επίσης παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ROS για τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη. Τέλος, τα δείγματα

τυρογάλακτος κατά τους καλοκαιρινούς μήνες έδειξαν μειωμένη παραγωγή ROS. Αναφορικά με τον ΟΟΓ, το πρόβειο D-P3 είχε αυξημένη αναστολή ROS.

Συμπερασματικά, το τυρόγαλα και ο όξινος ορός γιαούρτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών λόγω των ωφέλιμων δράσεων που επέδειξαν. Συνολικά, τα αποτελέσματα στοιχειοθετούν πως τα πρόβεια γαλακτοκομικά υποπροϊόντα είχαν καλύτερο προφίλ από τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα με αγελαδινή ή αίγεια προέλευση γάλακτος ως προς τις αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενώ ανέδειξαν και πιο ισχυρή ανοσορυθμιστική δράση. Επιπρόσθετα, η επιβεβαίωση των παρατηρούμενων διαφορών θα μπορούσε να επιτευχθεί με *in vivo* μελέτες σε ζώα ή κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται επίσης αναγκαία για να προσδιοριστούν οι αλληλουχίες των πεπτιδίων από γαλακτοκομικά υποπροϊόντα με πιθανή ανοσορυθμιστική, αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική δράση ή πλειοτροπική δράση *in vivo*.

Επιστημονική περιοχή: βιολειτουργικές ιδιότητες γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Λέξεις κλειδιά: τυρόγαλα, όξινος ορός γιαούρτης, *in vitro* γαστρεντερική πέψη, ανοσορύθμιση, βιοχημικές μέθοδοι, *in vitro* κυτταρικά μοντέλα

Evaluation of immunomodulatory, antihypertensive and antioxidant properties of dairy by-products

Department of Animal Sciences
Laboratory of Animal Breeding & Husbandry

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the biofunctional properties of dairy by-products, in particular, sweet whey (SW) and acid whey (AW), by-products resulted from hard and semi-hard cheeses manufacture and strained Greek yoghurt processing, respectively. A thorough analysis on the immunomodulatory, antihypertensive and antioxidant properties of SW and AW was conducted. The major differences are based that AW has lower pH and lower protein content than SW. The rapid growth of the world population, the consumer interest to shift to biofunctional foods combined with the development of science and technology has led to research on the concurrent utilization of dairy by-products, including SW and AW. The continuous increase in the production of dairy products leads to enormous amounts of by-products, therefore it is imperative to utilize them in new ways to produce novel products with a variety of applications.

Firstly, dairy by-products were obtained from bovine, ovine, caprine and a mixture of ovine/caprine (only for SW) milk from dairy factories and several small-scale cheese plants in mainland Greece during the year. Freeze-drying of liquid SW and AW was carried out to remove water and other solvents, and then protein content of all samples was determined by the Kjeldahl method. Afterwards, the *in vitro* gastrointestinal digestion procedure of the samples was modified using the protocol reported by the amended and improved digestion method INFOGEST 2.0. Then, in order to remove high molecular weight peptides from digestates (D), membrane filters with 10 kDa (D-P10) and 3 kDa (D-P3) MWCO were used.

The human monocyte/macrophage cell line THP-1 (with and without LPS challenge) and the RAW 264.7 murine macrophage cell line (LPS challenge) were used to evaluate the immunomodulatory properties. The effect of D-P3 on gene expression of cytokines, transcription factors and other proteins implicated in the immune response as well as the inhibition of nitric oxide (NO) was studied in order to investigate immune regulation. More than a few changes in gene expression were observed and some important ones are mentioned. Decreased *IL1B* and *ICAM1* mRNA expression levels were noticed in cells exposed to ovine and mixture of ovine/caprine SW-D-P3 and decreased *IL6* and *TLR4* mRNA expression levels only for ovine SW-D-P3. *CXCL8* relative expression was increased for bovine, ovine, ovine/caprine SW-D-P3 compared to BL-D-P3. Moreover, a decrease in *STAT2*, *NFE2L2*, *HMOX*, *SOD* and *CAT* mRNA levels was observed in THP-1 cells exposed to SW-D-P3 compared to BL-D-P3. After activation of cellw with LPS, a significant increase in *CXCL8* and *CAT* was noticed for SW regardless of animal origin, while a decrease in *IRF5* expression was observed. *TNF* and *STAT1* levels were greater only for ovine SW-D-P3 and gene expression of *ICAM1*, *STAT2*, *MYD88* and *HMOX1* in cells incubated with bovine SW-D-P3. Furthermore, a decrease of *IL1B*, *TGFB*, *LST1*, *NFKB1*, *STAT2*, *MYD88*, *CXCL8* and *TLR2* expression was observed in THP-1 macrophages exposed to ovine AW-D-P3. After incubation of LPS, a reduction in *TLR4* and *IRF5* was presented for ovine AW-D-P3, while an increase of *IL10* and *STAT1* expression was observed for bovine and

caprine AW-D-P3. Regarding the anti-inflammatory potential studied in RAW 264.7 activated cells, a decrease in *Nos2* gene expression was observed for caprine and ovine SW-D-P3 compared to BL-D-P3. This decrease was translated into a reduced NO production only in ovine SW. Inhibition of NO production was observed for ovine and caprine AW-D-P3, although no corresponding reduction in *Nos2* mRNA levels was detected.

For the study of antihypertensive properties, ACE inhibitory activity of SW and AW was determined before and after *in vitro* digestion for D-P3 and D-P10 fractions, as it has been reported that antihypertensive effect is associated with low molecular peptides resulting from gastrointestinal digestion. ACE inhibitory activity of SW and AW after *in vitro* digestion was greatly increased for both D-P10 and D-P3. Moreover, increased ACE inhibitory activity was observed in ovine SW-D-P10 and SW-D-P3 compared to caprine and bovine. SW obtained from Ditiki Ellada and Thessalia had better antihypertensive activity for D-P3 fraction compared to the other two regions. Seasonality did not affect ACE inhibitory activity of SW, while ACE inhibition of AW was improved after *in vitro* digestion for D-P10 fraction for AW collected during summer months.

For the study of antioxidant properties, the antioxidant activity of dairy by-products was determined by the biochemical methods ORAC, ABTS, FRAP and P-FRAP before and after *in vitro* digestion (D and D-P3 fraction). Overall, better antioxidant capacity of 3-10 times was observed after *in vitro* digestion, depending on the method used. An increase was observed before digestion by ORAC method for bovine SW, with this difference being absent after digestion. Conversely, greater antioxidant activity was observed in ovine SW compared to bovine SW by ABTS method before and after digestion. Moreover, better antioxidant activity was observed for ovine AW by ORAC after *in vitro* digestion. Differences were noticed for AW-D-P3 in terms of seasonality, with summer ones showing enhanced antioxidant activity. Regarding geographical origin of AW, samples obtained from the Peloponnese and Central Greece revealed augmented antioxidant activity before digestion by ABTS method. Then, cellular antioxidant activity of D-P3 was studied using HT-29, a human colon cell line, in the presence of H₂O₂. Inhibition of reactive oxygen species (ROS) of ovine SW-D-P3 was increased compared H₂O₂-treated cells, and ROS levels were decreased for samples obtained from Macedonia and Thrace. Finally, AW collected during summer months showed reduced ROS production and ovine AW-D-P3 had greater ROS inhibition compared to BL-D-P3.

In conclusion, according to the results of this thesis, SW and AW could be utilized to a greater extent in the food and feed industry due to their beneficial effects. The overall results document that ovine dairy by-products had a better profile than caprine and bovine ones regarding antihypertensive and antioxidant properties and a more robust immunomodulatory effect. As well, a validation of the observed differences could be achieved by *in vivo* animal studies or human clinical trials. Further research is also deemed necessary to determine the peptides' sequences of from dairy by-products with potential immunomodulatory, antihypertensive, antioxidant or pleiotropic activity *in vivo*.

Scientific Area: biofunctional properties of dairy by-products

Keywords: sweet whey, acid whey, *in vitro* gastrointestinal digestion, immunoregulation, biochemical assays, *in vitro* cellular models

© Ελένη Δ. Νταλάκα

Αξιολόγηση ανοσορυθμιστικών, αντιυπερτασικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγορευτικής των προσβολών της. Πάντως κατά το ν.2121/1993, όπως μεταγενέστερα τροποποιήθηκε ιδίως με το αρ. 81, ν. 3057/2002 καθώς και με τα αρ. 1,2 και 4, ω. 3524/2007 και τη διεθνή σύμβαση της Βέρνης (που έχει κυρωθεί με το ν.100/1975), απαγορεύεται η αναδημοσίευση και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιονδήποτε τρόπο, (ηλεκτρονικό, μηχανικό, φωτοτυπικό, ηχογράφησης ή άλλο) τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια εμού. Το μη αποκλειστικό δικαίωμα αναπαραγωγής αντιγραφής (για λόγους ασφάλειας και συντήρησης) και διάθεσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπό ηλεκτρονική μορφή, για εκπαιδευτική, ερευνητική και ιδιωτική χρήση και όχι για χρήση που αποσκοπεί σε εμπορική εκμετάλλευση, παραχωρείται στη Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

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.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας το απαιτητικό και παράλληλα, πολύ εποικοδομητικό κεφάλαιο της Διδακτορικής μου Διατριβής, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω όλους εκείνους που ήταν συνεχώς στο πλευρό μου έμπρακτα. Ευχαριστώ καθηγητές, συναδέλφους, φίλους και οικογένεια για την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού.

Πρωτίστως, για την εκπόνηση μιας σωστής διδακτορικής διατριβής απαιτείται σωστή καθοδήγηση και στήριξη από τον επιβλέποντα Καθηγητή σου. Για αυτό και εγώ από μεριάς μου, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Θεοδώρου Γεώργιο για την πολύτιμη και ουσιαστική επίβλεψη, συνεργασία και υποστήριξη για τα πέντε αυτά χρόνια της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης, για την αισιόδοξη «ματιά» του και τις στιγμές που περάσαμε εντός και εκτός Εργαστηρίου.

Θα ήθελα να καταθέσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου στον κ. Πολίτη Ιωάννη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας για την αρωγή του από τα πρώτα βήματα του προπτυχιακού κύκλου ως και σήμερα. Ευχαριστώ τον κ. Μπόση Ιωάννη, Καθηγητή του Α.Π.Θ για τη συμμετοχή του στη συμβουλευτική επιτροπή καθώς και για την άριστη συνεργασία μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την καθηγήτρια κ. Μοάτσου Γκόλφω, τις Επίκουρες Καθηγήτριες κ. Μοσχοπούλου Αικατερίνη και κ. Μαυρίκου Σοφία καθώς και τον Ερευνητή Γ' κ. Κατσαρό Γεώργιο για τη συμμετοχή τους και για τις επισημάνσεις τους της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που βοήθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ξεχωριστά ευχαριστώ τον κο Στέφο Γιώργο για τις πολύτιμες συμβουλές του και την κα Σαββίδου Αγγελική για τις πολύωρες εργαστηριακές αναλύσεις και για το ευχάριστο περιβάλλον που δημιουργήσαμε, ώστε η διάρκεια των σπουδών μας να είναι πιο ομαλή και δημιουργική.

Τέλος, ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου, Δημήτριο και Αθηνά, οι οποίοι ήταν δίπλα μου συνεχώς και μου έδιναν κουράγιο να συνεχίζω, τους φίλους μου για την ευχάριστη παρέα τους που ήταν καθοριστικής σημασίας σε αρκετές στιγμές κατά τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού και τον σύντροφο μου, Παναγιώτη, ο οποίος από την πρώτη στιγμή συμμεριζόταν τους προβληματισμούς και της ανησυχίες μου και μέχρι και σήμερα δεν έπαψε να στηρίζει κάθε απόφασή μου.

Ελένη Δ. Νταλάκα
Οκτώβριος, 2023

Table of Contents

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
ABSTRACT	V
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	27
1.2 Γαλακτοκομικά υποπροϊόντα	28
1.2.1 Εισαγωγή	28
1.2.2 Σύσταση τυρογάλακτος	29
1.2.3 Σύσταση ΟΟΓ	29
1.2.4 Σύγκριση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων	30
1.2.5 Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος στα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα	31
1.2.6 Αξιοποίηση γαλακτοκομικών υποπροϊόντων	32
1.3. Βιοενεργά συστατικά	33
1.3.1 Εισαγωγή	33
1.3.2 Βιοενεργά πεπτίδια και η σημασία τους στην υγεία	34
1.3.3 Βιοενεργά πεπτίδια γαλακτοκομικών προϊόντων	35
1.4 Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες	39
1.4.1 Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα	39
1.4.2 Έμφυτη ανοσία	40
1.4.3 Επίκτητη ανοσία	40
1.4.4 Αλληλεπίδραση έμφυτης και επίκτητης ανοσίας	41
1.4.5 Ο ρόλος των μονοκυττάρων/μακροφάγων.....	42
1.4.6 Φαινότυποι M1 και M2 των μακροφάγων και μονοπάτια σηματοδότησης.....	43
1.4.7 Μεταγραφικός έλεγχος πύλωσης των μακροφάγων	46
1.4.8 Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνο και υποδοχείς αναγνώρισης (PAMPs, PPRs)	49
1.4.9 Τα μονοπάτια σηματοδότησης TLRs.....	51
1.4.10 Χρήση <i>in vitro</i> κυτταρικών μοντέλων για μελέτη της ανοσορύθμισης	54
1.4.11 Ανοσορυθμιστική δράση γαλακτοκομικών προϊόντων.....	56
1.5 Αντιυπερτασικές ιδιότητες	60
1.5.1 Εισαγωγή	60
1.5.2 Συστήματα ρύθμισης αρτηριακής πίεσης	61
1.5.3 Ρύθμιση και θεραπεία της υπέρτασης.....	64
1.6 Αναστολείς του ACE.....	65

1.7 Αντιοξειδωτική δράση	69
1.7.1 Εισαγωγή	69
1.7.2 Μηχανισμός/Λειτουργίες ελεύθερων ριζών	70
1.7.3 Κατηγορίες/ρόλος των αντιοξειδωτικών	73
1.7.4 Δράση αντιοξειδωτικών	74
1.7.5 Αντιοξειδωτική δράση γαλακτοκομικών προϊόντων	75
1.7.6 Αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών ορού του γάλακτος	76
1.7.7 Μέθοδοι εκτίμησης και προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	83
3.1. Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων.....	83
3.2 <i>In vitro</i> προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης.....	85
3.3 Κλασμάτωση δειγμάτων μετά την πέψη	88
3.4 Μελέτη ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων βιοενεργών πεπτιδίων τυρογάλακτος και ΟΟΓ	90
3.4.1 THP-1: <i>In vitro</i> κυτταρικό μοντέλο για ανοσορύθμιση	90
3.4.2 RAW 264.7: <i>In vitro</i> κυτταρικό μοντέλο για αντιφλεγμονώδες δυναμικό	96
3.5 Μελέτη αντιπερτασικών ιδιοτήτων	99
3.5.1 Προσδιορισμός της ACE ανασταλτικής ιδιότητας (ACE inhibitory activity)	99
3.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων	99
3.5.3 Έλεγχος καπτοπρίλης	99
3.5.4 Προσδιορισμός της ACE ανασταλτικής δράσης με FAP-GG ως υπόστρωμα.....	100
3.6 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης	101
3.6.1 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών οξυγόνου με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescence).....	101
3.6.2 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα 2,2' αζινο-δισ-[3-αιθυλοβενζολινο-6-σουλφονικού οξέος] ([2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]; ABTS).....	102
3.6.3 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δράσης (ferric reducing antioxidant power; FRAP)	103
3.6.4 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής ισχύος (P-FRAP;reducing power).....	104

3.6.5 Δοκιμή αντιοξειδωτικής δράσης πεφθέντων κλασμάτων χαμηλού μοριακού βάρους (digested retentate 3kDa) στην κυτταρική σειρά HT-29	105
3.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
4.1 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης	109
4.1.1 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης για το τυρόγαλα	109
4.1.2 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης	134
4.2 Αποτελέσματα αντιυπερτασικής δράσης.....	159
4.2.1 Αποτελέσματα αντιυπερτασικής δράσης για το τυρόγαλα	159
4.2.2 Αποτελέσματα αντιυπερτασικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης	162
4.3 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης	165
4.3.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης για το τυρόγαλα	165
4.3.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης	176
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	187
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	218
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	220

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.1: Βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος και θεραπευτικές δυνατότητες _____	35
Διάγραμμα 1.2: Συνοπτική απεικόνιση του συστήματος Κ-Κ-Σ _____	62
Διάγραμμα 1.3: Συνοπτική απεικόνιση του συστήματος Ρ-Α-Σ _____	64
Διάγραμμα 1.4: Επισκόπηση αντιδράσεων που οδηγούν σε σχηματισμό ROS _____	72
Διάγραμμα 1.5: Κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών _____	74

Διάγραμμα 4.1: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _____	113
Διάγραμμα 4.2: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _	117
Διάγραμμα 4.3: Επίδραση της επχικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _____	119
Διάγραμμα 4.4: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	123
Διάγραμμα 4.5: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	126
Διάγραμμα 4.6: Επίδραση της εποχικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> , (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi)	

<i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	128
Διάγραμμα 4.7: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	130
Διάγραμμα 4.8: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	131
Διάγραμμα 4.9: Επίδραση της εποχικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	132
Διάγραμμα 4.10: Επίδραση του SW-D-P3 στην παραγωγή νιτρικού οξέος % σε LPS ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα ως προς: (i) την ζωική προέλευση, (ii) τη γεωγραφική προέλευση και (iii) την εποχικότητα _____	133
Διάγραμμα 4.11: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>LST1</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _____	137
Διάγραμμα 4.12: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>LST1</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _	141
Διάγραμμα 4.13: Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>TGFB1</i> (v) <i>LST1</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα _____	144
Διάγραμμα 4.14: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	148
Διάγραμμα 4.15: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii)	

<i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	151
Διάγραμμα 4.16: Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) <i>IL1B</i> , (ii) <i>CXCL8</i> , (iii) <i>IL6</i> , (iv) <i>IL10</i> (v) <i>TNF</i> , (vi) <i>ICAM1</i> , (vii) <i>NFKB1</i> , (viii) <i>RELA</i> , (ix) <i>TLR2</i> , (x) <i>TLR4</i> , (xi) <i>STAT1</i> , (xii) <i>STAT2</i> , (xiii) <i>IRF5</i> , (xiv) <i>MYD88</i> , (xv) <i>NFE2L2</i> , (xvi) <i>HMOX1</i> , (xvii) <i>SOD</i> , (xviii) <i>CAT</i> σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες _____	153
Διάγραμμα 4.17: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	154
Διάγραμμα 4.18: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	156
Διάγραμμα 4.19: Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) <i>Nos2</i> , ii) <i>Ptgs2</i> , iii) <i>Il6</i> και iv) <i>Tnf</i> σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 µg/mL LPS για 24 ώρες _____	157
Διάγραμμα 4.20: Επίδραση του AW-D-P3 στην παραγωγή νιτρικού οξέος % σε LPS ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα ως προς: i) την ζωική προέλευση, ii) τη γεωγραφική προέλευση και iii) την εποχικότητα _____	158
Διάγραμμα 4.21 Πρότυπη καμπύλη καπτοπρίλης σε εύρος συγκέντρωσης 1-27 nM για τον έλεγχο εγκυρότητας της μεθόδου _____	159
Διάγραμμα 4.22: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει ζωικής προέλευσης τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη) _____	160
Διάγραμμα 4.23: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει γεωγραφικής προέλευσης τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη) _____	161
Διάγραμμα 4.24: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει εποχικότητας τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). _____	162

Διάγραμμα 4.25: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει ζωικής προέλευσης ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη) _____	163
Διάγραμμα 4.26: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει γεωγραφικής προέλευσης ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη) _____	163
Διάγραμμα 4.27: Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει εποχικότητας ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη) _____	164
Διάγραμμα 4.28: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	166
Διάγραμμα 4.29: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	167
Διάγραμμα 4.30: Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	167
Διάγραμμα 4.31: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	168
Διάγραμμα 4.32: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	168
Διάγραμμα 4.33: Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	169
Διάγραμμα 4.34: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	169

Διάγραμμα 4.35: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	170
Διάγραμμα 4.36: Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	170
Διάγραμμα 4.37: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	171
Διάγραμμα 4.38: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	171
Διάγραμμα 4.39: Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3) _____	172
Διάγραμμα 4.40: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H ₂ O ₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες) _____	173
Διάγραμμα 4.41: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H ₂ O ₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες) _____	174
Διάγραμμα 4.42: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H ₂ O ₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες) _____	175
Διάγραμμα 4.43: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	177

Διάγραμμα 4.44: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	178
Διάγραμμα 4.45: Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	178
Διάγραμμα 4.46: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	179
Διάγραμμα 4.47: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	179
Διάγραμμα 4.48: Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	180
Διάγραμμα 4.49: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	180
Διάγραμμα 4.50: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	181
Διάγραμμα 4.51: Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	181
Διάγραμμα 4.52: Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	182
Διάγραμμα 4.53: Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	182
Διάγραμμα 4.54: Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3) _____	183
Διάγραμμα 4.55: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος	

πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). _____ 184

Διάγραμμα 4.56: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10⁴ κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες)_____ 185

Διάγραμμα 4.57: Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10⁴ κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες)_____ 186

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Σύσταση γλυκού και όξινου ορού γιαούρτης από αγελαδινό γάλα _____	30
Πίνακας 1.2: Βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων _____	37
Πίνακας 1.3: Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν _____	55
Πίνακας 1.4: Πηγές ελεύθερων ριζών _____	70
Πίνακας 1.5: Οι πιο κοινές αναλύσεις αντιοξειδωτικής δράσης, οι μηχανισμοί δράσης και τα τελικά προϊόντα _____	78

Πίνακας 3.1: Διαχωρισμός δειγμάτων ανά ζωική, γεωγραφική προέλευση και εποχικότητα για τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα καθώς και η μέση τιμή πρωτεΐνης και pH _____	84
Πίνακας 3.2: Ενεργότητες ενζύμων και συγκέντρωση χολικών αλάτων _____	86
Πίνακας 3.3: Ποσότητες αλάτων για την παρασκευή διαλυμάτων SSF, SGF και SIF ____	86
Πίνακας 3.4: Ορισμός δειγμάτων που προκύπτουν κατά την προσομοίωση της <i>in vitro</i> γαστρεντερικής πέψης _____	89
Πίνακας 3.5: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση σε THP-1 μακροφάγα και ενεργοποιημένα μακροφάγα _____	94
Πίνακας 3.6: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση σε RAW 264.7 ενεργοποιημένα μακροφάγα _____	98

Πίνακας 4.1: Ανασταλτική δράση του ενζύμου ACE %, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης τυρογάλακτος, πριν και μετά την <i>in vitro</i> γαστρεντερική πέψη _____	160
Πίνακας 4.2: Ανασταλτική δράση του ενζύμου ACE %, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης ΟΟΓ, πριν και μετά την <i>in vitro</i> γαστρεντερική πέψη _____	162
Πίνακας 4.3: Αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους ORAC-FL, FRAP, P-FRAP και ABTS για το τυρόγαλα, πριν (SW) και μετά την <i>in vitro</i> πέψη (SW-D και SW-D-P3), ανεξάρτητα από την προέλευση του γάλακτος _____	166
Πίνακας 4.4: Αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους ORAC-FL, FRAP, P-FRAP και ABTS για τον ΟΟΓ, πριν (AW) και μετά την <i>in vitro</i> πέψη (AW-D και AW-D-P3), ανεξάρτητα από την προέλευση του γάλακτος _____	176

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών σηματοδότησης των πολωμένων μακροφάγων _____	46
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση αλληλεπίδρασης M1 και M2 φαινοτύπου και μεταγραφικός έλεγχος που εμπλέκεται. _____	48
Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση των συνδετών, προσαρμογέων και των τελικών προϊόντων του σηματοδοτικού μονοπατιού των TLRs. _____	51
Εικόνα 1.4: MyD88 εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs _____	53
Εικόνα 1.5: MyD88-μη εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs _____	54

Εικόνα 3.1: Αναπαράσταση χρόνου και ροής της μεθόδου <i>in vitro</i> πέψης τροφίμου INFOGEST 2.0 _____	87
Εικόνα 3.2: Διάγραμμα ροής διαφοροποίησης της THP-1 ανθρώπινης μονοκύτταρης σειράς σε μακροφάγα με PMA και διέγερσης των μακροφάγων με LPS _____	91

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

α-LA: alpha lactalbumin; α-λακταλβουμίνη
β-LG: beta lactoglobulin; β-γαλακτογλοβουλίνη
AAPH: 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride; διυδροχλωρική 2,2'-αζοβις(2-μεθυλοπροπιοναμιδίνη)
ABTS: 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid); 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ)
ACE: angiotensin converting enzyme I; μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης-I
ACTB: actin beta; ακτίνη β
AP-1: activator protein 1; πρωτεΐνη ενεργοποιητής
APC: antigen presenting cell; αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
B2M: beta-2-microglobulin; β-2 μικροσφαιρίνη
BHT: butylated hydroxytoluene; βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο
BSA: bovine serum albumin; αλβουμίνη του βοείου ορού
CAA: cellular antioxidant activity; κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα
CAT: catalase; καταλάση
CCL2: C-C motif chemokine ligand 2; χημειοκίνη-προσδέτης με μοτίβο C τύπου 2
CN: casein; καζεΐνη
CoQ10: coenzyme Q10; συνένζυμο Q10
Cp: crossing point; σημείο διασταύρωσης
CYC1: cytochrome C1; κυτόχρωμα C1
DCFH: 2',7' dichloro-dihydro-fluorescein; 2',7'-διυδρο-διχλωροφλουορεσκεΐνη
DCFH-DA: 2',7' dichlorofluorescein diacetate; 2',7'-διόξινη διχλωροφλουορεσκεΐνη
DMSO: dimethyl sulfoxide; διμεθυλοσουλφοξείδιο
Dnase I: deoxyribonuclease I; δεοξυριβονουκλεάση I
DTD: DT-diaphorase; DT διαφοράση
e: electron; ηλεκτρόνιο
EDTA: ethylene diamine tetracetic acid; αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

Et-OH: ethanol; αιθανόλη
FA-PGG: furanacroloyl-Phe-Glu-Glu
FBS: fetal bovine serum; βόειος εμβρυϊκός ορός
FRAP: ferric reducing antioxidant power; μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δράσης σιδήρου
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulation factor; παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
GMP: glycomacropetide; γλυκομακροπεπτίδιο
GSH: glutathione; γλουταθειόνη
GSHPx: Glutathione peroxidase; υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
H2O2 : hydrogen peroxide; υπεροξείδιο του υδρογόνου
HAT: hydrogen atom transfer; μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου
HMOX1: heme oxygenase 1; οξυγενάση της αίμης
HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; 1-φωσφοριβοζυλο-τρανσφεράση της υποξανθίνης
ICAM1: intercellular adhesion molecule 1; μεσοκυττάριο μόριο 1 προσκόλλησης
IFN-γ: interferon gamma; ιντερφερόνη γ
IL10: interleukin 10; ιντερλευκίνη 10
IL1B: interleukin 1 beta; ιντερλευκίνη 1 β
IL6: interleukin 6; ιντερλευκίνη 6
IL8: interleukin 8; ιντερλευκίνη 8
IRAK: interleukin 1 receptor associated kinase; κινάση σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1
IRFs: interferon regulatory factors; ρυθμιστικοί παράγοντες της ιντερφερόνης
IRF5: interferon regulatory factor 5; ρυθμιστικός παράγοντας 5 της ιντερφερόνης
JNK: Jun N-terminal kinase; Jun N-τελική κινάση
Lf: lactoferrin; λακτοφερίνη
LFcin B: lactoferricin B; λακτοφερίνη B
LP: lactophorin; λακτοφορίνη

LPS: lipopolysaccharide from E. coli; λιποπολυσακχαρίτης από το E. coli
LPX: lactoperoxidase; λακτοπεροξειδάση
LST1; leukocyte specific transcript 1; ειδικό μετάγραφο λευκοκυττάρων
MHC: major histocompatibility complex; μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MWCO: molecular weight cut-off; μεμβράνη υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής
MYD88: myeloid differentiation factor 88; πρωτεΐνη πρώιμης απόκρισης στη μυελοειδή διαφοροποίηση 88
MYD88; innate immune signal transduction adaptor; έμφυτος προσαρμογέας μεταγωγής σήματος ανοσοποιητικού
NaNO ₂ : sodium nitrite; νιτρώδες νάτριο
NED: N-(1-naphthyl) ethylenediamine; N-(1-ναφθυλ) αιθυλενοδιαμίνη
NFE2L2: NFE2 like bZIP transcription factor 2; ερυθροειδής πυρηνικός παράγοντας σχετιζόμενος με το δομικό μοτίβο βασικών πρωτεϊνών λευκίνης
NFKB1: nuclear Factor Kappa B p50 Subunit; πυρηνικός παράγοντας της κ ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων υπομονάδας p50
NK cells: natural killer cells; φυσικά φονικά κύτταρα
NO: nitric oxide; νιτρικό οξύ
NO ₂ - : nitrous ions; νιτρώδη ιόντα
NO ₃ - : nitrate ions; νιτρικά ιόντα
NOS2: nitric oxide synthase 2, inducible 1; επαγωγή-1 συνθετάση- 2 του νιτρικού οξειδίου
PAMPs: pathogen associated molecular patterns; μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
P-FRAP: potassium ferricyanide reducing power; αναγωγική ισχύς σιδηροκυανιούχου καλίου
PMA: phorbol 12- myristate 13- acetate; εστέρας της φορβόλης
PRRs: pattern recognition receptors; υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων
PTGS2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2; συνθετάση-2 προσταγλανδίνης-ενδοϋπεροξειδίου (κυκλοξυγονάση-2)
RELA: nuclear factor Kappa-B P65 subunit; πυρηνικός παράγοντας της κ ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων υπομονάδας p65

ROS: reactive oxygen species; δραστικές ρίζες οξυγόνου
RPL37a: ribosomal protein L37a; L37a ριβοσωμική πρωτεΐνη
RPS18: ribosomal protein S18; S18 ριβοσωμική πρωτεΐνη
RT: room temperature; θερμοκρασία δωματίου
SET: single electron transfer; μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου
SGF: simulated gastric fluid; διάλυμα γαστρικού υγρού
SIF: simulated intestinal fluid; διάλυμα εντερικού υγρού
SOCS: suppressor of cytokine signaling; καταστολέας της σηματοδότησης κυτοκινών
SOD: superoxide dismutase; δισμουτάση του υπεροξειδίου
SOD1: superoxide dismutase 1; δισμουτάση 1 του υπεροξειδίου
SSF: simulated salivary fluid; διάλυμα προσομοίωσης σιελογόνου υγρού
STAT1: signal transducer and activator of transcription 1; μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 1; ενεργοποιητής μεταγραφής STAT1
STAT2: signal transducer and activator of transcription 2; μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 2; ενεργοποιητής μεταγραφής STAT2
t-BOOH: tert-butyl hydroperoxide; τριτ-βουτυλ υδροϋπεροξειδίο
TAK1: transforming growth factor-β- activated protein kinase 1; πρωτεϊνική κινάση-1 ενεργοποίησης από τον β αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού
TCRs: T-cell receptors; υποδοχείς T-κυττάρων
TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; αντιοξειδωτική ικανότητα ισοδύναμης με Trolox
TGFB1: transforming growth factor beta 1; αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β1
TLR2: Toll Like Receptor 2; υποδοχέας τύπου Toll 2; ανάλογο του Toll υποδοχέα 2
TLR4: Toll Like Receptor 4; υποδοχέας τύπου Toll 4; ανάλογο του Toll υποδοχέα 4
TLRs: Toll-like receptors; Toll-like υποδοχείς
TNF: tumor necrosis factor; παράγοντας νέκρωσης όγκων
TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου
Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; 6-υδροξυ- 2,5,7,8-τετραμεθυλο-2-καρβοξυλικό οξύ

UBC: ubiquitin; ουμπικιτίνη
WP: whey protein; πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος
WPC: whey protein concentrate; Συμπύκνωμα πρωτεΐνης του ορού του γάλακτος
WPI: whey protein isolate; απομονωμένη πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ένα μεγάλο μέρος του παραγόμενου γάλακτος διοχετεύεται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως είναι το τυρί και η γιαούρτη. Η κατανάλωση αυτών των γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζει συνεχόμενη αύξηση παγκοσμίως. Από την επεξεργασία για την παραγωγή των δύο αυτών προϊόντων προκύπτει σημαντικός όγκος υποπροϊόντων. Υπολογίζεται πως ετησίως οι παραγόμενες ποσότητες τυρογάλακτος (ΤΓ) και όξινου ορού γιαούρτης (ΟΟΓ) ξεπερνούν τα 180-190 εκατ. τόνους (Chandrapala *et al.*, 2015; Uduwerella, 2017; Osorio-González *et al.*, 2022). Βάσει της εκτίμησης πως η ετήσια αύξηση είναι 1-2%, η προβλεπόμενη παραγωγή των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων θα πλησιάζει τους 240 εκατομμύρια τόνους το 2030 (Buchanan *et al.*, 2023)

Τόσο το τυρόγαλα όσο και ο ορός από τη στραγγιστή γιαούρτη θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου και της υψηλής ζήτησης οξυγόνου για βιοαποδόμηση, περίπου 27-60g/L και 60-85 g/L, αντίστοιχα (Yadav, Yan, Pilli, Kumar, R.D. Tyagi, *et al.*, 2015; Valdez Castillo *et al.*, 2020) και του χαμηλού pH (pH < 6,5) με το pH του ΟΟΓ να πλησιάζει το 3,5 (Smithers, 2015), με αποτέλεσμα να επιφέρουν οικονομικές και περιβαλλοντικές προκλήσεις.

Δεδομένης της ανάγκης μείωσης των αποβλήτων και της αυστηριοποίησης της νομοθεσίας για την απόρριψη γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην περαιτέρω αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων. Μερικές από τις εφαρμογές τους είναι στη γεωργία ως λίπασμα, στη διατροφή των ζώων σε συνδυασμό με ζωοτροφές καθώς και ως βιοκαύσιμο (Rocha-Mendoza *et al.*, 2021).

Σε πλήθος εργασιών αναφέρονται βιολειτουργικές ιδιότητες γαλακτοκομικών προϊόντων και των υποπροϊόντων τους που αποδίδονται στα βιοενεργά πεπτίδια και έχουν αντιοξειδωτική, αντιυπερτασική, αντιφλεγμονώδη, ανοσοτροποποιητική, οπιοειδή, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή δράση και άλλες (Pihlanto-Leppälä, 2000; Gauthier, Pouliot and Saint-Sauveur, 2006; Korhonen, 2009; Mann *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2020).

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη γαλακτοκομικών υποπροϊόντων (τυρόγαλα και ΟΟΓ) ως προς τις ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εύρεση βιολειτουργικών ιδιοτήτων των υποπροϊόντων της τυροκόμησης (τυρόγαλα) και της παρασκευής στραγγιστής γιαούρτης (όξινος ορός γιαούρτης) παρουσιάζει τόσο εθνικό όσο και εγχώριο ενδιαφέρον και αναμένεται να προσδώσουν προστιθέμενη αξία μέσω της ανάδειξης των βιολειτουργικών ιδιοτήτων τους.

1.2 Γαλακτοκομικά υποπροϊόντα

1.2.1 Εισαγωγή

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής για περίπου 8000 χρόνια και σε πολλές χώρες είναι απαραίτητο τμήμα της καθημερινής διατροφής. Με την πάροδο των χρόνων, οι καταναλωτές δίνουν μεγάλη προσοχή στην τροφή που λαμβάνουν καθώς υπάρχει άμεση σχέση της διατροφής και της ανθρώπινης υγείας (Rozenberg *et al.*, 2016).

Το γάλα είναι αποκλειστική τροφή κατά το πρώτο στάδιο της ζωής του ανθρώπου και των θηλαστικών ζώων. Αποτελεί πλήρη, απλή φυσική τροφή που περιέχει πρωτεΐνες, λίπος, υδατάνθρακες, μέταλλα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία και άλλα συστατικά. Το γάλα μαζί με τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαίτα των νέων, διότι συμβάλλει σημαντικά στον εφοδιασμό του οργανισμού με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και ενισχύει την ισορροπημένη διατροφή.

Η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται από τη σύνθεση του γάλακτος που ποικίλλει ανάλογα με το είδος και τη φυλή (Gorelik *et al.*, 2021), την εποχή και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (Sevi *et al.*, 2004), τη διατροφή και το σύστημα διατροφής (Morand-Fehr *et al.*, 2007), τη συχνότητα και τη μέθοδο άμελξης (Klei *et al.*, 1997), το περιβάλλον (Bernabucci, Basiricò and Morera, 2013) και άλλων παραγόντων. Μεταξύ των συστατικών του γάλακτος, στις πρωτεΐνες έχει επικεντρωθεί το ενδιαφέρον της έρευνας καθώς αποτελούν απαραίτητα συστατικά της διατροφής συμβάλλοντας σε σημαντικές θρεπτικές, βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες. Το προφίλ των αμινοξέων τόσο των καζεϊνών όσο και των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος κατέχουν μοναδική θέση στην ανθρώπινη διατροφή. Τα δύο αυτά κλάσματα των πρωτεϊνών κατατάσσονται στις ποιοτικές πρωτεΐνες με υψηλή βιολογική αξία και ικανοποιητική πεπτικότητα (97%-98%) (Rafiq *et al.*, 2016).

1.2.2 Σύσταση τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα αποτελεί υποπροϊόν της τυροκομίας και είναι το κιτρινοπράσινο υγρό που διαχωρίζεται κατά τη διάρκεια της πήξης του γάλακτος και της στράγγισης του τυροπήγματος κατά την τυροκόμηση. Η χρήση πυτιάς συμβάλλει στην υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος και σημαντικό μέρος των πεπτιδίων που δημιουργούνται μεταφέρονται στο τυρόγαλα.(Tsakali *et al.*, 2010). Το τυρόγαλα περιέχει τα υδατοδιαλυτά συστατικά του γάλακτος και τα κυριότερα συστατικά του είναι η λακτόζη και οι πρωτεΐνες του ορού. Το τυρόγαλα αντιπροσωπεύει το 75-90 % του συνολικού όγκου του γάλακτος (1 μέρος τυριού: 9 μέρη τυρογάλακτος) και τα ποσοστά ποικίλουν ανάλογα με το είδος του τυριού που παρασκευάζεται και την τεχνολογία που εφαρμόζεται (Królczyk *et al.*, 2016). Έτσι, η περιεκτικότητά του τυρογάλακτος σε ολικά στερεά συστατικά κυμαίνεται 6-8 %, σε πρωτεΐνες (σχεδόν αποκλειστικά του ορού) 0,8-1,5 %, σε λακτόζη 4-5 %, σε λίπος 0,1-1 %, σε ανόργανα στοιχεία 0,5-0,7 % και σε γαλακτικό οξύ 0,1-0,2 %. Αξίζει να σημειωθεί πως το τυρόγαλα περιέχει μικρό ποσοστό (0,1%) του συνόλου των καζεϊνών που διαφεύγει από το τυροπήγμα στο τυρόγαλα (Smithers, 2008). Επίσης περιέχει μικρό ποσοστό υδατοδιαλυτών βιταμινών του γάλακτος, κυρίως αυτές που ανήκουν στις βιταμίνες του συμπλέγματος Β, όπως η ριβοφλαβίνη που προσδίδει το χαρακτηριστικό κιτρινοπράσινο χρώμα στο υποπροϊόν αυτό (Bleoussi *et al.*, 2020). Τέλος, εντοπίζονται ίχνη από ένζυμα (μέρος της πυτιάς που προστίθεται κατά την τυροκόμηση, λακτουπεροξειδάση) και άλλες ουσίες όπως το γλυκομακροπεπτίδιο (GMP) και το σιαλικό οξύ (Silva-Hernandez, Nakano and Ozimek, 2002).

1.2.3 Σύσταση ΟΟΓ

Ο όξινος ορός προκύπτει από διεργασίες ζύμωσης του γάλακτος κατά τη διαδικασία παρασκευής γιαούρτης και φρέσκων τυριών με αλοιφώδη υφή όπως ricotta και cottage (Bleoussi *et al.*, 2020). Πιο συγκεκριμένα, ως στραγγιστό γιαούρτι ορίζεται το προϊόν που λαμβάνεται μετά από αποστράγγιση μέρους του ορού από το γιαούρτι και μετά τη πήξη έχει κατ' ελάχιστο 5,6% πρωτεΐνες για αγελαδινό ή αίγαιο γάλα και 8% για το πρόβειο γάλα και το μέρος του νερού και των υδροδιαλυτών συστατικών που στραγγίζεται είναι ο όξινος ορός γιαούρτης. Το υποπροϊόν αυτό αντιπροσωπεύει περίπου τα 2/3 του αρχικού γάλακτος που προορίζεται για την παρασκευή στραγγιστής γιαούρτης και έχει την ακόλουθη σύνθεση με την λακτόζη να κυμαίνεται στο 3.5%, η πρωτεΐνη να είναι 0,15-0,3% και το pH γύρω στο 4,5 (Menchik *et al.*, 2019).

1.2.4 Σύγκριση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Οι βασικές διαφορές μεταξύ γλυκού και όξινου ορού εντοπίζονται στο pH, την ποσότητα λακτόζης και του γαλακτικού οξέος, την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος και το προφίλ μετάλλων. Το τυρόγαλα περιέχει μικρότερη περιεκτικότητα ιόντων ασβεστίου και ανιόντων φωσφορικών αλάτων και γαλακτικού οξέος. Στην περίπτωση του όξινου ορού γιαούρτης, το pH μειώνεται κατά τη ζύμωση μέχρι το ισοηλεκτρικό σημείο pH 4,6 ως αποτέλεσμα της μετατροπής της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Η καθίζηση καζεϊνών σε συνδυασμό με τα άλατα ασβεστίου, οδηγεί σε απελευθέρωση ανόργανων στοιχείων, κυρίως ασβεστίου και φωσφόρου (2,9 και 2,3 φορές υψηλότερο σε σχέση με το τυρόγαλα), με αποτέλεσμα να περνούν στον όξινο ορό (Bleoussi *et al.*, 2020). Η ποσότητα τέφρας για τον όξινο ορό είναι υψηλότερη λόγω υψηλότερης περιεκτικότητας σε ορισμένα μέταλλα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο τυρόγαλα είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με εκείνη του όξινου ορού γιαούρτης λόγω τεχνολογικών διαφορών που εντοπίζονται στην παραγωγή ορού γαλακτοκομικών προϊόντων (Merkel, Voropaeva and Ondrušek, 2021).

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση του ενζύμου της πυτιάς για την παραγωγή σκληρών και ημίσκληρων τυριών έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού στην κ-καζεΐνη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό παρα-κ-καζεΐνης. Η παρα-κ-καζεΐνη παραμένει προσκολλημένη στα μικκύλια καζεΐνης και το GMP παραμένει στο διαλυτό μέρος, αυξάνοντας την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης στο τυρόγαλα (Nishanthi, Vasiljevic and Chandrapala, 2017). Στον πίνακα 1.1 αναφέρεται συνοπτικά η σύσταση γλυκού και όξινου ορού και οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δύο γαλακτοκομικά υποπροϊόντα.

Πίνακας 1.1 Σύσταση γλυκού και όξινου ορού γιαούρτης από αγελαδινό γάλα (Προσαρμοσμένο από τους Smithers 2015, Uduwerella 2017, Mechnik 2019, Božanić 2014)

Συστατικά	Γλυκός ορός	Όξινος ορός Γιαούρτης
Ολικά στερεά %	6,3	<6
Ολική πρωτεΐνη %	~ 0,75	<0,3
Λίπος %	<0,1	<0,1
Τέφρα %	0,5	0,8
Λακτόζη %	4,9	<5
Γαλακτικό οξύ %	~ 0.1	~ 1
pH	>5,6	<4,5

1.2.5 Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος στα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι πρωτεΐνες του όρου γάλακτος χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα για τα πολλαπλά οφέλη που προσφέρει στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κυριότερες πρωτεΐνες του ορού είναι οι: β-γαλακτογλοβουλίνη και α-λακταλβουμίνη, ακολουθούν οι: ανοσοσφαιρίνες, αλβουμίνη του ορού, λακτοφερίνη, λακτουπεροξειδάση, λυσοζύμη και πρωτεόζες-πεπτόνες. Το GMP εντοπίζεται μόνο στο τυρόγαλα καθώς προέρχεται από την υδρόλυση της καζεΐνης από το ένζυμο χυμοσίνη κατά την πήξη του γάλακτος με πυτιά.

β-γαλακτογλοβουλίνη (β-Lg)

Η β-Lg αποτελεί το 50% της περιεκτικότητας της πρωτεΐνης του ορού του γάλακτος, σε αντίθεση με το ανθρώπινο γάλα όπου δε συναντάται. Το μοριακό βάρος της β-Lg είναι 18 kDa, αποτελείται από 162 αμινοξέα στο μόριο τους και είναι η πιο αλλεργιογόνος πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος (Geiselhart, Podzhilkova and Hoffmann-Sommergruber, 2021). Έχει την ικανότητα να δεσμεύει μη πολικά μόρια όπως τη ρετινόλη, τη βιταμίνη D, το ασβέστιο λόγω του υδρόφοβου μορίου που διαθέτει συντελώντας στην απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα τους (Gurta and Prakash, 2017).

α-λακταλβουμίνη (α-La)

Η α-La αντιπροσωπεύει περίπου το 15% της περιεκτικότητας της πρωτεΐνης του ορού του γάλακτος, το μοριακό της βάρος είναι 14 kDa και αποτελείται από 123 αμινοξέα. Περιέχει σε μεγάλη αναλογία τα απαραίτητα αμινοξέα, όπως η λευκίνη, λυσίνη, τρυπτοφάνη και θειούχα αμινοξέα.(Mollea, Marmo and Bosco, 2013). Η α-La έχει αναφερθεί πως έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Πιο αναλυτικά, μπορεί να συνδεθεί με το ελαϊκό οξύ και να σχηματίσει ένα σύμπλοκο (σύμπλοκο BAMLET για βόεια πρωτεΐνη και σύμπλοκο HAMLET για ανθρώπινη πρωτεΐνη), το οποίο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα έναντι κυτταρικών σειρών και (Hernández-Ledesma, Ramos and Gómez-Ruiz, 2011).

Ανοσοσφαιρίνες ή ανοσογλοβουλίνες (Igs)

Είναι ετερογενής ομάδα γλυκοπρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους και παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Διακρίνονται τρεις ομάδες ανοσοσφαιρινών στα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα και είναι οι IgG (IgG1 και IgG2), IgA και IgM. Επίσης,

συναντώνται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα, περνούν άθικτες από το γαστρεντερικό σύστημα του νεογνού στο αίμα με αποτέλεσμα να ενισχύουν το ανοσοποιητικό του σύστημα (Korhonen, Marnila and Gill, 2000).

Αλβουμίνη του ορού (BSA)

Η αλβουμίνη του ορού αντιπροσωπεύει περίπου το 6%, είναι ένα μακρόστενο μόριο (σε αντίθεση με τις 2 προηγούμενες που είναι σφαιρικές), αποτελείται από 582 αμινοξέα και είναι πηγή όλων των απαραίτητων αμινοξέων. Συνδέεται με τα λιπαρά οξέα και έτσι συμμετέχει στη σύνθεση λιπιδίων. Αυτό οφείλεται τόσο στο μέγεθος όσο και στη δομή που έχει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Gupta and Prakash, 2017).

Πρωτεόζες και πεπτόνες (PP)

Οι PP είναι ανθεκτικές στη θέρμανση σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού. Επιπρόσθετα, είναι ένα σύνθετο μίγμα πεπτιδίων και στην ομάδα αυτή συντάσσεται και το συστατικό PP3, η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των λιποσφαιρίων (Deeth and Bansal, 2018).

Λακτοφερίνη (Lf)

Η Lf είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος και αντιπροσωπεύει περίπου το 1% του συνόλου. Έρευνες έχουν αναφέρει πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συνδέεται με πολλές δράσεις, ανάμεσά τους και οι αντιμικροβιακές, ανοσορυθμιστικές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές. Η βασική ιδιότητα της Lf είναι η δέσμευση του σιδήρου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα) και η μεταφορά του στον εντερικό βλεννογόνο, αποτελώντας μέρος της έμφυτης ανοσίας (Madureira *et al.*, 2007; Gupta and Prakash, 2017).

1.2.6 Αξιοποίηση γαλακτοκομικών υποπροϊόντων

Παρά το γεγονός της θρεπτικής αξίας των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρύποι. Περιορισμένη χρήση σε συμπληρώματα ζωοτροφών πραγματοποιείται για τον ΟΟΓ. Με τη συνεχόμενη αύξηση της κατανάλωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων και της αυστηροποίησης της νομοθεσίας, είναι επιτακτική η ανάγκη χρήσης των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων. Έχουν υψηλό οργανικό φορτίο (Biological Oxygen Demand; BOD) και υψηλή ζήτηση οξυγόνου για βιοαποδόμηση (Chemical Oxygen Demand; COD), με τις τιμές BOD και COD να κυμαίνονται περίπου 27-60 g O₂/L και 50-102 g O₂/L αντίστοιχα (Yadav, Yan, Pilli, Kumar, R. D. Tyagi, *et*

al., 2015) και ακόμη μεγαλύτερες τιμές να σημειώνονται για τον ΟΟΓ (Smithers, 2015), με αποτέλεσμα να επιφέρουν περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις. Έτσι, η αποτελεσματική χρήση και μετατροπή των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων σε ένα φάσμα συμπληρωμάτων διατροφής για τον άνθρωπο ολοένα και αυξάνεται (Deeth and Bansal, 2018). Συνολικά, χρησιμοποιείται σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου το 50% του ορού και μέσω εξερεύνησης νέων δυνατικών χρήσεων θα ήταν εφικτό να αξιοποιηθεί ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό. Ένα μέρος του ορού χρησιμοποιείται σε υγρή μορφή, το 30% περίπου σε μορφή σκόνης, το 15% για παραγωγή λακτόζης και το υπόλοιπο 10% για την παραγωγή συμπυκνωμάτων πρωτεϊνών του ορού (Kosseva *et al.*, 2009).

1.3. Βιοενεργά συστατικά

1.3.1 Εισαγωγή

Βιοενεργά συστατικά είναι ουσίες φυτικής και ζωικής προέλευσης που αποδεδειγμένα συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας είτε υποβοηθώντας τη λειτουργία του οργανισμού, είτε μέσω της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών, με *in vivo* μελέτες σε ζώα και με κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες. Οι ουσίες αυτές ανήκουν στα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά ή και στα προϊόντα διάσπασης των μακροθρεπτικών συστατικών (βιοενεργά πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες, λιπαρά οξέα) (Ali *et al.*, 2022).

Ως βιοπροσβασιμότητα ενός θρεπτικού συστατικού ορίζεται το μέρος αυτού που είναι ικανό να είναι ελεύθερο από το βλωμό της τροφής στο έντερο και είναι διαθέσιμο για απορρόφηση από τον εντερικό βλεννογόνο ή είναι ικανό να έχει ωφέλιμη επίδραση. Ως βιοδιαθεσιμότητα ενός θρεπτικού συστατικού ορίζεται το ποσοστό αυτού του συστατικού που απορροφάται από τον εντερικό βλεννογόνο και στη συνέχεια μεταβολίζεται μέσω φυσιολογικών οδών.

Ο προσδιορισμός των βιοενεργών συστατικών απευθείας στο τρόφιμο είναι μικρής σημασίας, καθώς οι ενώσεις που φτάνουν στο κυκλοφορικό σύστημα προκύπτουν μετά από την πολύπλοκη διαδικασία της πέψης. Η βιοπροσβασιμότητα (ικανότητα απελευθέρωσης από το υπόστρωμα του τροφίμου) και κατ' επέκταση η βιοδιαθεσιμότητα (διαδικασία πέψης και απορρόφησης από τον εντερικό αυλό) ενός συστατικού εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ίδιου του τροφίμου που με τη σειρά τους επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της διεργασίας της πέψης (Santos *et al.*, 2019).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα εμφανίζουν αυξημένες προοπτικές για τη χρήση τους στη παραγωγή πολλαπλών λειτουργικών τροφίμων λόγω των βιοενεργών συστατικών που περιέχουν (Haque, Chand and Kapila, 2009; Giromini *et al.*, 2019). Πιο συγκεκριμένα, στα βιοενεργά συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων αυτών (τυρόγαλα και ΟΟΓ) ανήκουν οι πρωτεΐνες, οι ολιγοσακχαρίτες, οι βιταμίνες και τα δεσμευτικά ανοργάνων στοιχείων (Madureira *et al.*, 2007; Giromini *et al.*, 2019). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν την πιο πολύτιμη πηγή βιοενεργών πεπτιδίων (Korhonen, 2009) και στην παρούσα διατριβή.

1.3.2 Βιοενεργά πεπτίδια και η σημασία τους στην υγεία

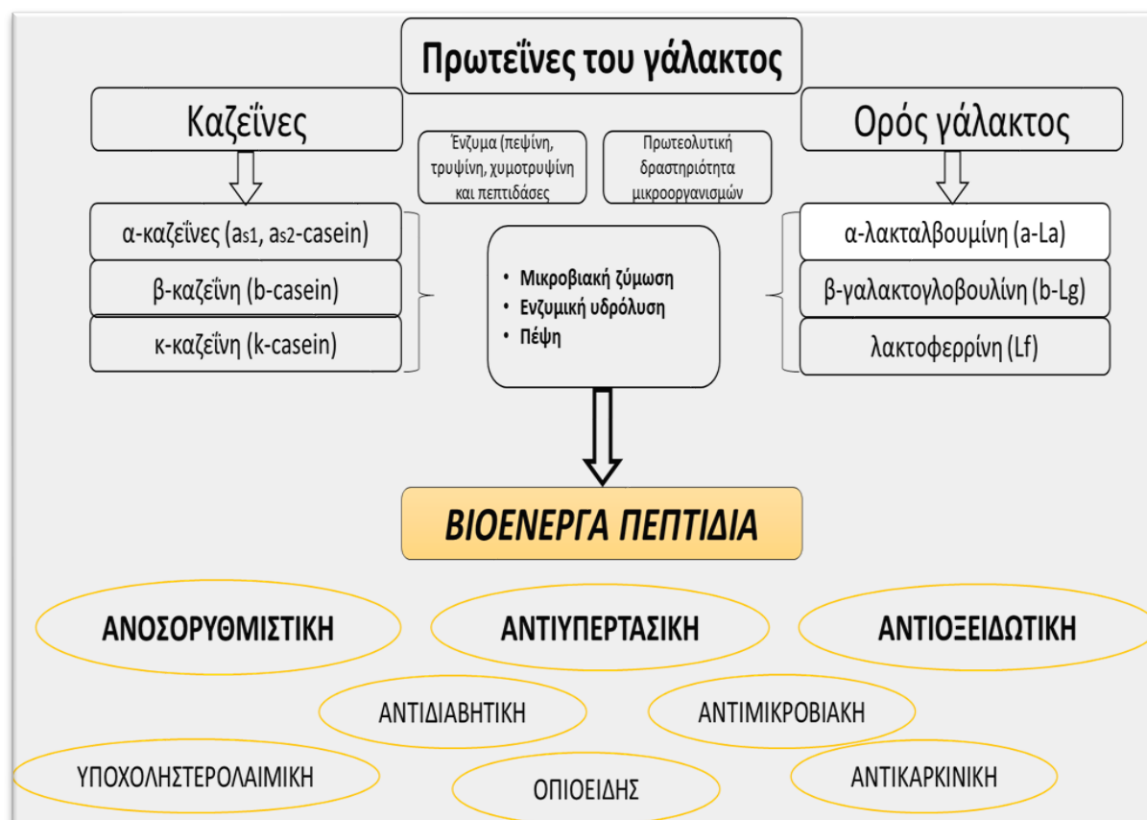
Τα βιοενεργά πεπτίδια ορίζονται ως αλληλουχίες αμινοξέων οι οποίες εκτός από την διατροφική τους αξία, επηρεάζουν θετικά τις βιολογικές διεργασίες του οργανισμού και την υγεία (Korhonen, 2009). Αυτά τα πεπτίδια είναι ανενεργά (κρυπτογραφημένα) εντός της μητρικής πρωτεϊνικής αλληλουχίας και πραγματοποιείται η απελευθέρωσή τους είτε με ενζυμική πρωτεόλυση *in vitro* είτε με πρωτεολυτική δράση των μικροοργανισμών ή στον γαστρεντερικό σωλήνα από πεπτικά ένζυμα όπως η πεψίνη, η τρυψίνη, η χυμοτρυψίνη και η παγκρεατίνη, και από ένζυμα πρωτεολυτικών μικροοργανισμών (*in vivo*) και αποδεσμεύουν το βιοενεργό θραύσμα (fragment) από την πρόδρομο πρωτεΐνη (Shahidi and Zhong, 2008; Meisel, 1997; Dullius, Goettert and de Souza, 2018; Mann *et al.*, 2018). Τα βιοενεργά πεπτίδια έχουν εντοπιστεί σε πρωτεΐνες προϊόντων ζωικής προέλευσης, μεταξύ των οποίων και το τυρόγαλα και ο ΟΟΓ, καθώς και φυτικής προέλευσης (Pihlanto, 2011).

Όσον αφορά τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από γαλακτοκομικά προϊόντα είναι μικρά σε μέγεθος και αποτελούνται συνήθως από 2 έως 20 αμινοξέα και το μοριακό τους βάρος είναι μικρότερο από 6000Da (Korhonen, 2009). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα ή ως συμπληρώματα διατροφής (Pihlanto, 2011).

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια έχουν πολλά οφέλη για την υγεία και ανάλογα με το είδος και την αλληλουχία των αμινοξέων τους, μπορούν να επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες του οργανισμού ασκώντας μεταξύ άλλων αντιφλεγμονώδεις-ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντικαρκινικές, οπιοειδείς, μεταλλοδεσμευτικές, και αντιμικροβιακές. Αρκετά από τα βιοενεργά πεπτίδια είναι πολυλειτουργικά και έχουν την ικανότητα να ασκούν περισσότερες από μία από τις προαναφερθείσες δράσεις (Yadav, Yan, Pilli, Kumar,

R.D. Tyagi, *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2016).

Στο διάγραμμα 1.1 παρουσιάζεται μία συνοπτική απεικόνιση παραγωγής πρωτεϊνών του γάλακτος και των βιοενεργών πεπτιδίων και οι πιθανές θεραπευτικές δυνατότητες αυτών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα μελετηθούν οι ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο του τυρογάλακτος όσο και του ΟΟΓ μετά από τη διαδικασία της *in vitro* γαστρεντερικής πέψης που θα υποβληθούν τα δείγματα.



Διάγραμμα 1.1 Βιοενεργά πεπτιδία γάλακτος και θεραπευτικές δυνατότητες

1.3.3 Βιοενεργά πεπτιδία γαλακτοκομικών προϊόντων

Τα βιοενεργά πεπτιδία μόλις απελευθερωθούν, είναι ικανά να επηρεάσουν θετικά μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού, όπως το γαστρεντερικό, το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό, το ενδοκρινικό και το νευρικό σύστημα. Οι πρωτεΐνες απαρτίζουν πληθώρα ενώσεων, οι οποίες διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, τη συγκέντρωση και τη λειτουργικότητά τους. Πληθώρα μελετών έχουν δείξει πως τα βιοενεργά πεπτιδία του γάλακτος ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, μειώνουν την αυξημένη αρτηριακή πίεση (FitzGerald, Murray and Walsh, 2004), καταπολεμούν τις γαστρεντερικές λοιμώξεις (Korhonen, Marnila and Gill, 2000),

βοηθούν στον έλεγχο του σωματικού βάρους και στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Park and Nam, 2015). Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται σε βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος και η βιολογική δράση των πεπτιδίων που εντοπίστηκε.

Πίνακας 1.2 Βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων

Βιοενεργό πεπτίδιο	Αλληλουχία	Προέλευση	Βιολογική δράση	Βιβλιογραφία
α_{s1} -CN f(102-109) α_{s1} -CN f(86-92)	KKYNVPL VPSERYL	Πρόβειο (Machengo τυρί)	Αναστολή ACE	Gómez-Ruiz, Ramos and Recio, 2002
α_{s2} -CN f(205-208)	VRYL	Πρόβειο (Machengo τυρί)	Αναστολή ACE	Ruiz, Ramos and Recio, 2004
β -CN f(133-138)	LHLPLP	Συνθετική αλληλουχία από	Αναστολή ACE	Quirós <i>et al.</i> , 2009
β -Lg f(19-29)	WYSLAMAASDI	Αγελαδινό γάλα	Αντιοξειδωτική	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
Lfcin B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	Αγελαδινό γάλα (ορός γάλακτος)	Αντιμικροβιακή	Alamdari and Ehsani, 2017
β -Lg	VAGTWY,	Αγελαδινό γάλα (ορός γάλακτος)	Αντιβακτηριακή	Alamdari and Ehsani, 2017
κ -CN f(112-116)	KDQDK	Πρόβειο	Αντιθρομβωτική	Qian <i>et al.</i> , 1995
β -Lg f(58-61) β -Lg f(103-105)	LQKW LLF	Αίγιο και πρόβειο γάλα	Αντιυπερτασική	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2002
Lf f(14-42)	PEWSKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRTSA	Αίγιο γάλα	Αντιβακτηριακή	Recio and Visser, 2000
Lf	RGDX	Πρόβειο	Αντιθρομβωτική	Rutherford and Gill, 2000
β -Lg f(62-73) β -Lg f(156-162) α -LA f(114-122)	LKPTPEGDLEIL LKALPMH ILDKVGINY	Αγελαδινό	Ανασταλτική δράση DPP-IV Αντιμικροβιακή	Worsztynowicz, Białas and Grajek, 2020
β -CN f(172-175) β -CN f(186-190)	LPVP MPVQA,	Γάλα καμήλας	Ανασταλτική δράση DPP-IV	Nongonierma <i>et al.</i> , 2018

Απομονωμένη πρωτεΐνη του ορού (WPI)	ND	ND	Μείωση έκφρασης IL8 και αντιοξειδωτική δράση	Piccolomini <i>et al.</i> , 2012
Lf	ND	Αγελαδινό	Αντιφλεγμονώδης	Yan <i>et al.</i> , 2013
b-Lg f(113–122)	PEQSLACQCL	Αίγαιο	Αναστολή ACE	Ibrahim, Ahmed and Miyata, 2017
a _{s1} -CN f(195-204) a _{s2} -CN f(123-130) β-CN f(30-40) β-CN f(207-219)	SDIPNPIGSE NPWDQVKR SLSSEESITH QEPVLGPVRGPF	Αίγαιο	Αντιδιαβητική	Gong <i>et al.</i> , 2020
β-Lg f (38–48) β-Lg f (113–122)	PLRVYVEELKP PEQSLACQCL	Αίγαιο	Αντιοξειδωτική	Ahmed <i>et al.</i> , 2015
LP f(79-89) Lf f(53-63) Lf f(277-288)	ATTLEGKLVEL KADAVTLDGGL KFRGRKPSGFQL	Γάλα καμήλας	Αντιοξειδωτική	Ibrahim, Isono and Miyata, 2018
β-CN f(15-163) a _{s1} -CN f(24-31)	VMFPPQSVL VVAPFPEV	Πρόβειο (πεκορίνο τυρί)	Αντιμικροβιακή	Rizzello <i>et al.</i> , 2005
β-Lg	QEVAGKWHVS AMAASDISLL DSESAPLRVY	Γάλα γαϊδούρας	Αναστολή ACE και αντιοξειδωτική	Aspri <i>et al.</i> , 2018
β-Lg f(43-58)	AASDISLLDAQSAPLR	Αίγαιο γάλα (από κεφίρ)	Αντιβακτηριακή	Izquierdo-González <i>et al.</i> , 2019

LP: lactophorin; λακτοφορίνη, Lf: lactoferrin; λακτοφερίνη, β-LG: beta lactoglobulin; β-γαλακτογλοβουλίνη; α-LA: alpha lactalbumin; α-λακταλβουμίνη CN: casein; καζεΐνη, LPX: lactoperoxidase; λακτοπεροξειδάση; LFc_{in} B: lactoferricin B; λακτοφερικίνη B, ACE: angiotensin converting enzyme; μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης; WPI: whey protein isolate; απομονωμένη πρωτεΐνη του ορού

1.4 Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες

1.4.1 Εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι από τα πιο πολύπλοκα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, το οποίο απαρτίζεται από ένα δίκτυο κυττάρων, ιστών και οργάνων. Ο φυσιολογικός του ρόλος έγκειται στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε παθογόνους παράγοντες όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί, τοξίνες, παράσιτα, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Επίσης, το ανοσοποιητικό σύστημα εμπλέκεται και στη συνολική ομοιόσταση του οργανισμού και ανταποκρίνεται τόσο σε εξωγενή όσο και σε ενδογενή «σήματα κινδύνου» (Matzinger, 2002). Αποτελείται από δύο βασικούς τύπους ανοσίας, την έμφυτη ή μη ειδική (innate immunity) αρχικά, και στη συνέχεια την επίκτητη ή ειδική ανοσία (specific immunity) (Iriti and Faoro, 2007). Η έμφυτη ανοσία, είναι ζωτικής σημασίας για την άμυνα του οργανισμού έναντι μολυσματικών παραγόντων και παρέχει άμεση αλλά μη ειδική απόκριση. Τα τελευταία χρόνια αναφέρεται πως η έμφυτη ανοσία αναδύεται και ως κρίσιμος ρυθμιστής φλεγμονωδών νόσων όπως είναι το άσθμα και αυτοάνοσων διαταραχών όπως ο διαβήτης τύπου 1 και της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (Turvey and Broide, 2010). Εν συνεχεία ενεργοποιείται και η ειδική ανοσία, όπου εμφανίζει πιο ισχυρές και συγκεκριμένες αποκρίσεις (μεγαλύτερη εξειδίκευση), έχει μεγαλύτερη διάρκεια και ικανότητα ανάπτυξης μνήμης (Robert and Brown, 2004; Iriti and Faoro, 2007). Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι λευκοκύτταρα που προέρχονται από πολυδύναμα ή αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Αιμοποιητικοί αναπτυξιακοί παράγοντες, όπως είναι οι κυτοκίνες, επάγουν τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Για τη διαφοροποίηση απαιτείται η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που καθορίζουν την πορεία διαφοροποίησης (lineage determining genes) σε συνδυασμό με μία σειρά μεταγραφικών παραγόντων (Kaushansky, 2006). Το λεμφικό σύστημα των θηλαστικών αποτελείται τόσο από τους πρωτογενείς ιστούς και όργανα (θύμος αδένας και μυελός των οστών) όπου συμβαίνει η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων σε λεμφοκύτταρα, όσο και από τους δευτερογενείς (π.χ. σπλήνας, λεμφαδένες, λεμφικοί ιστοί διάχυτους λεμφικούς ιστούς των βλεννογόνων), όπου πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων με τα αντιγόνα. Τέλος, κεντρικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία διαδραματίζουν τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα) καθώς και άλλοι τύποι κυττάρων όπως είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα

(natural killer cells-NK κύτταρα), δενδριτικά και μαστικά κύτταρα, ενώ στην επίκτητη εμπλέκονται τα T και τα B λεμφοκύτταρα (Turvey and Broide, 2010).

1.4.2 Έμφυτη ανοσία

Η λειτουργία της έμφυτης ανοσίας είναι πολύπλευρη και οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας περιλαμβάνουν τόσο ανατομικούς και χυμικούς φραγμούς όσο και τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης και της δράσης των NK-κυττάρων καθώς και τη φλεγμονώδη αντίδραση (Liaskou, Wilson and Oo, 2012). Τα κύτταρα που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία (μονοκύτταρα και μακροφάγα) είναι σε θέση να αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο (pathogen associated molecular patterns-PAMPs) όπως είναι τα συστατικά μικροοργανισμών [λιποπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, βακτηριακό και ιικό DNA, λιποπολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων (lipopolysaccharide; LPS)] και ενδογενείς συνδέτες μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors; PRRs) όπου περιλαμβάνει υποδοχείς για υδατάνθρακες βακτηρίων και Toll-like υποδοχέων (Toll-like receptors; TLRs) (Kawai and Akira, 2006).

1.4.3 Επίκτητη ανοσία

Στις περιπτώσεις που η έμφυτη ανοσία δεν καταφέρει να εξουδετερώσει το αντιγόνο, κινητοποιείται ο ειδικός μηχανισμός της επίκτητης ανοσίας. Επακολουθεί η αύξηση της αμυντικής ικανότητας του οργανισμού συμμετέχοντας τόσο τα λεμφοκύτταρα όσο και τα προϊόντα που εκκρίνουν. Διακρίνεται σε χυμική, όπου συμμετέχουν τα B-λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους (αντισώματα) και κυτταρική όπου συμμετέχουν τα B-και T-λεμφοκύτταρα (Turvey and Broide, 2010).

Η απόκριση των T-κυττάρων περιλαμβάνει 4 διακριτές ρυθμιστικές φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την αναγνώριση του αντιγόνου και καθορίζει την ειδικότητα της απόκρισης των T-κυττάρων. Το πεπτίδιο του αντιγόνου παρουσιάζεται ως μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex; MHCII) σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells; APC) και ενώνεται με υποδοχείς των T-κυττάρων (T-cell receptors; TCRs), οι οποίοι είναι ειδικοί για το αντιγόνο, σε αρχέγονα T κύτταρα. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει το σημείο ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από τη σύνδεση διεγερτικών/ανασταλτικών μοριακών ζευγών. Στην τρίτη φάση αποτυπώνεται η διέγερση κυτοκινών που ενισχύουν την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Matzinger, 2002; Smith-Garvin, Koretzky and Jordan,

2009). Τα ενεργοποιημένα APC παράγουν διάφορες κυτοκίνες ενισχύοντας τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων. Στην τελευταία φάση λαμβάνει χώρα η αναγνώριση των σημάτων κινδύνου που σχετίζονται με τους μεταβολίτες (metabolite-associated danger signals; MADS) σε συνδυασμό με μικρούς μοριακούς μεταβολίτες (Sun *et al.*, 2020).

Η απόκριση των B-κυττάρων χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία. Εμπλέκονται κύτταρα σχετιζόμενα με την απόκριση T-κυττάρων και B-κύτταρα μη εξαρτώμενα από τα T-λεμφοκύτταρα. Διακρίνονται 3 φάσεις και υποδιαιρούνται στη φάση της αναγνώρισης που αναγνωρίζεται το αντιγόνο και καθορίζεται η ειδικότητα της απόκρισης και ποιος υποδοχέας είναι ο κατάλληλος για την αναγνώριση του αντιγόνου, τη δεύτερη φάση της ενεργοποίησης και την τρίτη φάση της εκτέλεσης που περιλαμβάνει τη διέγερση κυτοκινών και την ενίσχυση της απόκρισης των B-κυττάρων (Sun *et al.*, 2020).

1.4.4 Αλληλεπίδραση έμφυτης και επίκτητης ανοσίας

Είναι γνωστό πως οι δύο κατηγορίες της ανοσιακής απάντησης, έμφυτη και επίκτητη, παρουσιάζουν ισχυρή αλληλεπίδραση. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται για την αλληλεπίδραση της έμφυτης και της επίκτητης είναι περίπλοκοι αλλά και καθοριστικής σημασίας. Παρουσιάζονται συνοπτικά 3 μηχανισμοί αλληλεπίδρασης:

- ✚ Τα APC μπορούν να σχηματιστούν από κύτταρα της κλασικής οδού και υπό όρους από κύτταρα της έμφυτης ανοσιακής απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος, με σκοπό να γεφυρώσουν τις 2 κατηγορίες,
- ✚ Στα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, τα μοριακά ζεύγη συνδέονται με κύτταρα τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας και κατευθύνουν μονόδρομες και αμφίδρομες αντιδράσεις. Τα σημεία ελέγχου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες εξαρτώμενης βάσει της λειτουργίας είτε διεγερτική ή ανασταλτική και
- ✚ Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός κατά τη διάρκεια των ανοσιακών αποκρίσεων οδηγεί σε υπέρμετρη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species; ROS). Αυτό οφείλεται στην αυξημένη γλυκόλυση και στη διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, οι οποίες είναι δύο κύριες μεταβολικές αλλαγές που γίνονται κατά την προφλεγμονώδη ανοσιακή

απόκριση και συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή ROS που είναι καθοριστικές τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές διεργασίες (Dai *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020).

Εν κατακλείδι, πλήθος κυττάρων, ιστών και οργάνων συμμετέχουν κατά την ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης. Αυτά περιλαμβάνουν επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, μαστικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά, μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK κύτταρα καθώς και Β και Τ-λεμφοκύτταρα. Όλα τα παραπάνω έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα μεσολαβητών που εν μέρει είναι υπεύθυνα για τις επιπτώσεις της φλεγμονής (Si-Tahar, Touqui and Chignard, 2009).

1.4.5 Ο ρόλος των μονοκυττάρων/μακροφάγων

Τα μονοκύτταρα είναι κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα, ενώ τα μακροφάγα εντοπίζονται μόνο στο σημείο της μόλυνσης/φλεγμονής. Το γεγονός που βοηθάει στην άμεση ανταπόκριση αναγνώρισης εισβολέων οφείλεται στην κυκλοφορία των μονοκυττάρων σε όλο το σώμα (Chanput, Mes and Wichers, 2014b, 2014a). Γενικά, είναι γνωστό πως πρωταρχικός ρόλος της έμφυτης ανοσίας είναι η εξάλειψη των παθογόνων και οι βασικές λειτουργίες των κυττάρων που εμπλέκονται είναι η φαγοκυττάρωση και η μείωση των μικροοργανισμών καθώς και η σύνθεση και η απελευθέρωση βιολογικών ενεργών μορίων στον οργανισμό. Σε αυτά τα μόρια ανήκουν οι κυτοκίνες, χημειοκίνες και τα χημειοτακτικά λιπίδια τα οποία κατευθύνουν συγκεκριμένα κύτταρα να μεταναστεύσουν στο σημείο της μόλυνσης και να δράσουν για την καταστροφή των παθογόνων (Si-Tahar, Touqui and Chignard, 2009). Τα μακροφάγα εντοπίζονται σε όλο το σώμα, βασικός τους στόχος είναι η ομοιοστασία του οργανισμού και η αντίσταση εισβολής των παθογόνων στον οργανισμό καθώς επίσης διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή (Daigneault *et al.*, 2010a). Τέλος, τα μακροφάγα ρυθμίζουν αποκρίσεις της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας στρατολογώντας και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα λεμφοκύτταρα (Lee 2018).

Τα μακροφάγα (M0) είναι δυναμικά και ετερογενή και ανάλογα με τον τρόπο ενεργοποίησής τους, ο οποίος εξαρτάται από τα σήματα που λαμβάνονται από το περιβάλλον, αναγνωρίζονται 2 υποκατηγορίες, η M1 ονομαζόμενη ως κλασική ενεργοποίηση και η M2 ως εναλλακτική ενεργοποίηση. Τα μακροφάγα ενεργοποιώντας διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης, οδηγούνται σε διαφορετική

έκφραση μορίων. Στο επόμενο κεφάλαιο, θα αναφερθούμε εκτενέστερα στους φαινότυπους των πολωμένων M1 και M2 μακροφάγων (Gharavi *et al.*, 2022).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές THP-1 (ως μακροφάγα προερχόμενα από διαφοροποιημένα μονοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης) και RAW 264.7 (μακροφάγα προερχόμενα από μύες) οι οποίες τις τελευταίες δεκαετίες, χρησιμοποιούνται εκτενώς *in vitro* ως κυτταρικά μοντέλα τόσο για τη διερεύνηση λειτουργιών, μηχανισμών και μονοπατιών σηματοδότησης των μονοκυττάρων και μακροφάγων όσο και για τη μελέτη κατά τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών.

1.4.6 Φαινότυποι M1 και M2 των μακροφάγων και μονοπάτια σηματοδότησης

Τα μακροφάγα διαχωρίζονται σε 2 κύριες υποκατηγορίες, τα ενεργοποιημένα με την κλασική (M1) και την εναλλακτική οδό (M2). Τα M1 μακροφάγα ενεργοποιούνται από την ιντερφερόνη γ (interferon- γ ; IFN- γ) ή/και LPS ή/και τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony stimulation factor; GM-CSF) και συμμετέχουν στους μηχανισμούς της επίκτητης ανοσιακής απάντησης. Τα M1 μακροφάγα παράγουν προφλεγμονώδη μόρια όπως τις ιντερλευκίνες 1, -6, -12, -23, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor- α ; TNF α) και τη συνθετάση-2 του νιτρικού οξειδίου (nitric oxide synthase 2; NOS2) και IFN- γ . Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 1 (T helper 1; Th1) είναι η κύρια πηγή παραγωγής της IFN- γ , παρά της συμμετοχής της για την ενεργοποίηση της M1 οδού. Η ενεργοποίηση M1 έχει αναφερθεί πως σχετίζεται με τη φλεγμονή ενώ η M2 με την ανοσορύθμιση και την αναδόμηση ιστών (Wang, Liang and Zen, 2014). Τα M1 μακροφάγα είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία του ξενιστή από ιούς και ενδοκυτταρικά βακτήρια κατά τη διάρκεια οξείων λοιμώξεων, ενώ τα M2 μακροφάγα εμπλέκονται σε χρόνιες μολυσματικές ασθένειες (Lee, 2019).

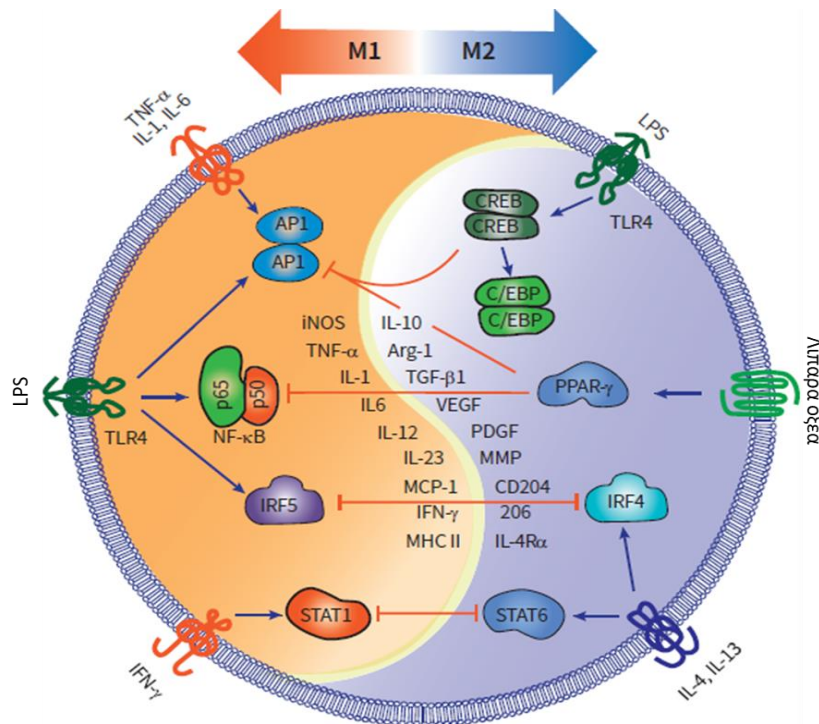
Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 οι Gordon *et al.*, καθώς μελετούσαν τη ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα της μαννόζης στα μακροφάγα, παρατήρησαν έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο πρόκλησης έκφρασης του υποδοχέα μέσω IL4. Έτσι, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μακροφάγα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με IL4 έδρασαν με έναν «εναλλακτικό τρόπο ενεργοποίησης ως προς το φαινότυπο» (Mosser, 2003). Οι IL4 και IL13 επάγουν τον εναλλακτικό τρόπο ενεργοποίησης των μακροφάγων, σε M2 μακροφάγα (Zhu *et al.*, 2015). Τα M2 μακροφάγα μπορούν να

διαιεθούν περαιτέρω στους υπότυπους M2a, M2b, M2c και M2d ανάλογα με το ερέθισμα και των μεταγραφικών αλλαγών που προκύπτουν (Gharavi *et al.*, 2022). Κοινό χαρακτηριστικό της M2 εναλλακτικής οδού είναι τα αυξημένα επίπεδα της IL10 και η παραγωγή της 1-αργινάσης (arginase-1; Arg-1). Το υψηλό επίπεδο Arg-1 καταστρέφει την L-αργινίνη, η οποία βλάπτει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή της IFN- γ . Αυξημένα επίπεδα Arg-1 ανταγωνίζονται περαιτέρω τη NOS2 για την L-αργινίνη και μειώνεται η παραγωγή νιτρικού οξέος (nitric oxide; NO) (Mills, 2015). Τα M2 μακροφάγα παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες ενώ οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (πχ. IL12) εντοπίζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τα M1 μακροφάγα αυξάνουν την κατανάλωση γλυκόζης και την απελευθέρωση γαλακτικού οξέος, ενώ παρατηρείται μειωμένος ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου. Αντιθέτως, τα M2 μακροφάγα χρησιμοποιούν μονοπάτια οξειδωτικού μεταβολισμού της γλυκόζης. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί πως ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, του σιδήρου και των βιταμινών σχετίζονται με την πόλωση των μακροφάγων (Zhu *et al.*, 2015).

Η βέλτιστη ισορροπία μεταξύ των μακροφάγων M1 και M2 είναι καθοριστικής σημασίας σε επίπεδο ανοσιακής ρύθμισης, καθώς οποιαδήποτε ανισορροπία ανάμεσα στις δύο καταστάσεις αναμένεται να προκαλέσει δυσλειτουργία στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η πλαστικότητα της μετάβασης των μακροφάγων μπορεί να αποδοθεί στα πολύπλοκα μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τους δύο αυτούς φαινότυπους (Gordon, 2003). Καθώς στη μετάβαση εμπλέκονται διάφορα μόρια που είναι κοινά και στους δύο φαινότυπους, θα μπορούσε να γίνει κατανοητό ότι η αλληλομετατροπή οφείλεται κυρίως στην επίδραση του ενός υποσυνόλου στο άλλο και αντίστροφα. Η μετάβαση μεταξύ των φαινοτύπων M1-M2 επηρεάζονται από αρκετούς παράγοντες και μονοπάτια και η λεπτομερής κατανόησή τους βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη (Saqib *et al.*, 2018). Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες λαμβάνουν χώρα στην πόλωση των μακροφάγων. Τα M1 μακροφάγα εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες όπως είναι ο πυρηνικός παράγοντας- κ B (Nuclear factor-kappa B; NF- κ B) και η πρωτεΐνη ενεργοποιητής (Activator protein 1; AP-1), ρυθμιστικό παράγοντα 5 της ιντερφερόνης (Interferon regulatory factor 5 ; IRF5) και τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής-1 (signal transducer and activator of transcription 1; STAT1). Τα M2 μακροφάγα εκφράζουν τους STAT6, IRF4, τον υποδοχέα ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού υπεροξεισώματος (peroxisome proliferator-

activated receptor; PPAR γ) και του μεταγραφικού παράγοντα απόκρισης στη πρωτεϊνική κινάση (cAMP-responsive element-binding protein; CREB). Όλοι οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν και εκφράζουν πλειάδα κυτοκινών και θεωρούνται ρυθμιστές της μετατροπής των μακροφάγων ως προς συγκεκριμένο φαινότυπο (Wynn, Chawla and Pollard, 2013; Kim *et al.*, 2019). Στην εικόνα 1.1 παρουσιάζονται τα μονοπάτια σηματοδότησης των M1 και M2 μακροφάγων και η αλληλεπίδραση τους.

Μεταξύ των πιο πρόσφατων φλεγμονωδών θεραπευτικών στρατηγικών με τη μεσολάβηση μακροφάγων, καταβάλλονται συνεχείς προσπάθειες για τη ρύθμιση της σηματοδότησης από το προφλεγμονώδες M1 μονοπάτι στο αντιφλεγμονώδες M2 μονοπάτι (Gensel *et al.*, 2017). Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερα φυσικά και συνθετικά συστατικά/ενώσεις έχουν αναγνωριστεί να ρυθμίζουν το μονοπάτι φλεγμονής από M1 στο M2. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση ανάμεσα στους φαινότυπους M1 και M2 παραμένει άγνωστος (Dugo *et al.*, 2017). Όμως, όσο η επιστημονική κοινότητα ανακαλύπτει νέα μόρια και μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με την κατάσταση των μακροφάγων M1 και M2, υπάρχει ελπίδα για μία πιο σαφή κατανόηση των πραγματικών μηχανισμών δράσης αυτών των ενώσεων.



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών σηματοδότησης των πολωμένων μακροφάγων. Αποτυπώνονται μηχανισμοί πόλωσης και η αλληλεπίδραση μεταξύ M1 και M2 μονοπατιού σηματοδότησης (Προσαρμοσμένο από Lee 2018)

1.4.7 Μεταγραφικός έλεγχος πόλωσης των μακροφάγων

Η IFN- γ ήταν η πρώτη κυτοκίνη που είχε ταυτοποιηθεί να επάγει την πόλωση ως προς τον M1 φαινότυπο. Η IFN- γ συνδέεται με τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση της τυροσίνης με τη μεσολάβηση κινασών Janus (Janus Associated Kinase 1/2; JAK1/2) και επακολουθεί ο διμερισμός του STAT1 (Darnell, Kerr and Stark, 1994). Επίσης η ενεργοποίηση του STAT1, έχει ως επακόλουθο τη φωσφορυλίωση μίας κρίσιμης θέσης σερίνης στο C άκρο που είναι απαραίτητη για τη μέγιστη λειτουργία της μεταγραφής (Varinou *et al.*, 2005; Barnholt *et al.*, 2009). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν αναδείξει και άλλες ισόμορφες STAT, συμπεριλαμβανομένων των STAT3 και STAT6 που ρυθμίζουν την πόλωση των μακροφάγων (Tugal, Liao and Jain, 2013). Τα STATs εμπλέκονται στην πόλωση ως προς τον φαινότυπο M1 που προκαλείται από τον LPS μέσω ενεργοποίησης του TLR4. Το TLR4 προάγει κυρίως μέσω του NF- κ B την μεταγραφή φλεγμονωδών γονιδίων-στόχων όπως συζητείται λεπτομερέστερα στο 1.4.8 κεφάλαιο. Γενικώς, έχει εδραιωθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ STAT1 και STAT6 για την πόλωση των κυττάρων M1 και M2,

είτε προς Th1 είτε προς Th2 ανοσιακή απόκριση που προκαλείται από IFN- γ και IL4, αντίστοιχα (Juhas *et al.*, 2015) (εικόνα 1.2.)

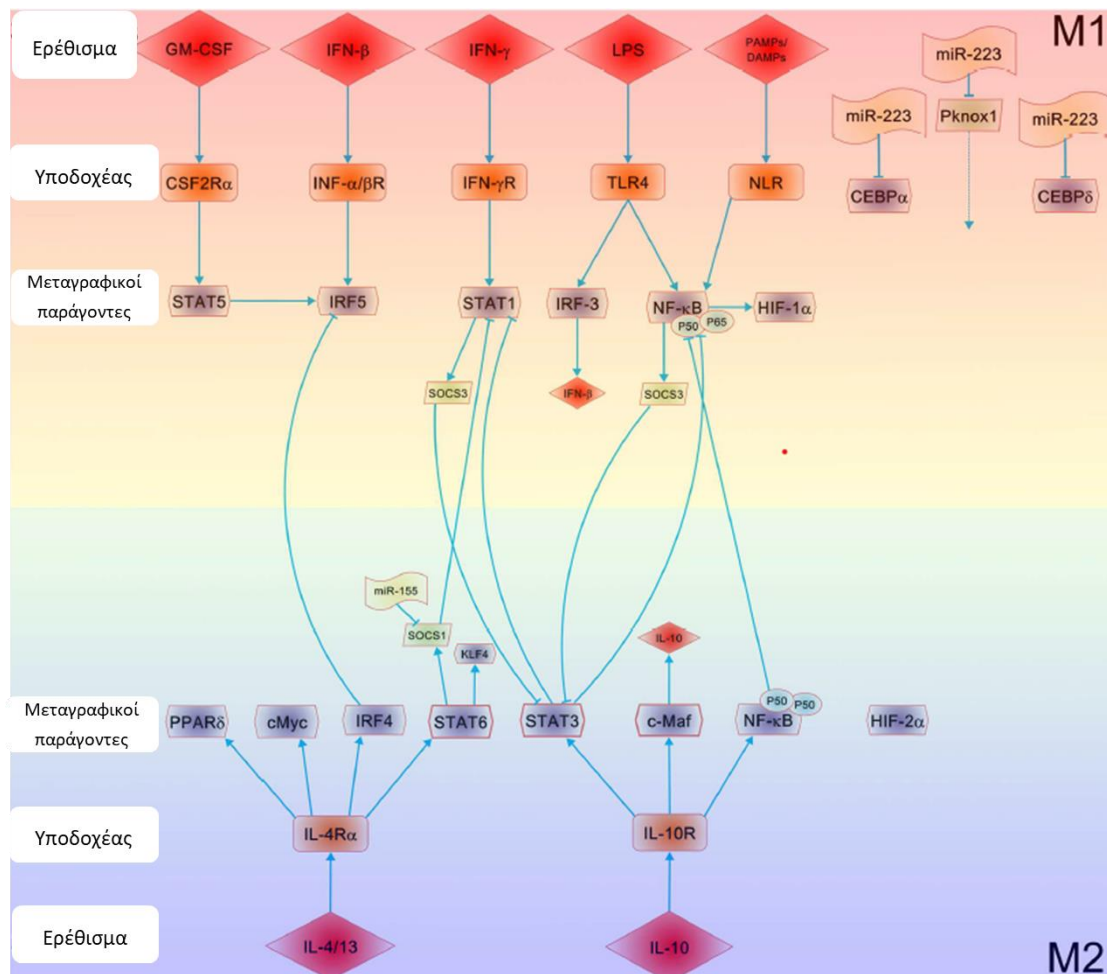
Επίσης ο STAT3 θεωρείται ο βασικός ρυθμιστής μεταγραφής της αντιφλεγμονώδους απόκρισης της IL10. Η IL10 ενώνεται με το σύμπλεγμα του υποδοχέα της (IL10R complex), ενεργοποιείται ο STAT3 μεσολαβώντας ο JAK1, με αποτέλεσμα την καταστολή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι οι IL1 β , IL12, TNF α και IFN γ . Αντιπροσωπεύει έναν ουσιαστικό ομοιοστατικό μηχανισμό που ελέγχει το βαθμό και τη διάρκεια της φλεγμονής (Hutchins, Diez and Miranda-Saavedra, 2013).

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων με τη μεσολάβηση των STATs, μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης JAK/STAT, ρυθμίζεται από ενδογενείς αναστολές, μέλη της οικογένειας των καταστολέων της σηματοδότησης κυτοκινών (suppressor of cytokine signaling; SOCS) (Wang, Liang and Zen, 2014). Απαριθμούνται 8 μέλη (SOCS1-SOCS7) με τους SOC1 και SOC3 να είναι τα πιο καλά μελετημένα μέλη όσον αφορά το ρόλο τους στη διαμόρφωση της πόλωσης M1 και M2 φαινότυπο και ενώ εμφανίζουν πολύ χαμηλή έκφραση στα M0 μακροφάγα, έχουν ταχύτατη έκφραση με την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Τα SOCS προκαλούν την αναστολή κυτοκινών με σημαντικό μηχανισμό για την αρνητική ρύθμιση και με αυτόν τον τρόπο διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον περιορισμό των αντιδράσεων στη φλεγμονή (Wilson, 2014). Έχει αναφερθεί πως η μειωμένη έκφραση του SOC1 μπορεί να ενισχύσει τον τραυματισμό και τη φλεγμονή των ιστών με υπέρμετρη λειτουργία του STAT1 προάγοντας την ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων και ενισχύοντας την ευαισθησία τους στην ογκογένεση (Yoshimura, Naka and Kubo, 2007).

Επίσης, οι IRFs αποτελούνται α Η σηματοδότηση IRF/STAT είναι κύριο μονοπάτι που ρυθμίζει την πόλωση των μακροφάγων. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης IRF/STAT από IFNs μέσω TLR οδηγεί τη λειτουργία των μακροφάγων προς τον φαινότυπο M1 (μέσω STAT1), ενώ η ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης IRF/STAT από τις IL4 ή/και IL13 οδηγεί τη λειτουργία των μακροφάγων προς τον φαινότυπο M2 (μέσω STAT2). Αναφορές υπάρχουν για τα IRF3 και IRF5 να συμμετέχουν πρωτίστως στο M1 φαινότυπο (Wang, Liang and Zen, 2014). Επιπρόσθετα, ο PPAR γ είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Συνιστά τον κύριο ρυθμιστή του μεταβολισμού των λιπιδίων στα μακροφάγα, όπου αναστέλλουν την έκφραση

προφλεγμονωδών γονιδίων μέσω πολλών μηχανισμών, όπως μέσω trans καταστολής του NF-κB (Juhás *et al.*, 2015).

Στις αρχές του 2000 ανακαλύφθηκε μία νέα κατηγορία μικρών μη κωδικοποιητικών τμημάτων RNA όπου έχουν αναδειχθεί ως σημαντικοί ρυθμιστές στις βιολογικές διεργασίες και ορίζονται ως miRNAs. Ένας ουσιαστικός ρόλος των miRNAs στη ρύθμιση της φαινοτυπικής πόλωσης των μακροφάγων είναι η στενή σύνδεση που υπάρχει ανάμεσα στην απορρύθμιση των miRNAs και την υπερβολική ή τη μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων.



Εικόνα 1.2 Απεικόνιση αλληλεπίδρασης M1 και M2 φαινοτύπου και μεταγραφικός έλεγχος που εμπλέκεται. Αναπαρίσταται η ισορροπία ανάμεσα στην ενεργοποίηση STAT1 και STAT3/STAT6, που ρυθμίζει την πόλωση των μακροφάγων με επικράτηση NF-κB και STAT1 ως προς M1 φαινότυπο, σε αντίθεση με τον M2 φαινότυπο που επικρατέστεροι μεταγραφικοί παράγοντες να είναι οι STAT3 και STAT6 (Προσαρμοσμένο από Wang 2014)

1.4.8 Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο και υποδοχείς αναγνώρισης (PAMPs και PRRs)

Ο Charles Janeway το έτος 1989 ανέφερε πρώτος πως οι δομές που εκφράζονται από παθογόνα μπορούν να αναγνωριστούν από υποδοχείς του αμυντικού συστήματος του ξενιστή. Ονομάτισε αυτές τις δομές PAMPs και ανέφερε πως αυτά τα διατηρημένα μοτίβα εκφράζονται από οικογένειες μικροοργανισμών τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Τα PAMPs περιλαμβάνουν τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) των Gram αρνητικών βακτηρίων, λιποπεπτίδια των Gram θετικών βακτηρίων και το δίκλωνο RNA ορισμένων ιών. Η βάση για την αναγνώριση του παθογόνου από το ξενιστή είναι η ανίχνευση των PAMPs και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των PAMPs με κυτταρικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs). Οι PRRs χωρίζονται σε υποδοχείς τύπου NODs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), υποδοχείς τύπου RIGs (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases) και υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) (Janeway and Medzhitov, 2002; Si-Tahar, Touqui and Chignard, 2009; Turvey and Broide, 2010). Η μόνη εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα θα πρέπει να είναι μικροοργανισμοί με τροποποιημένες δομές PAMPs που εμποδίζουν την ανίχνευση των PRRs, η οποία μπορεί να προκύψει από συνεξέλιξη με τον ξενιστή (Gauthier, Rotjan and Kagan, 2022). Τα ερωτήματα που μένουν να απαντηθούν είναι εάν τα PRRs των ευκαρυωτικών οργανισμών ανιχνεύουν όλους τους μικροοργανισμούς που δεν έχουν συνεξέλιξη με τον ξενιστή τους και εάν τα PAMPs εξελίχθηκαν για να ανιχνεύονται ολοκληρωτικά από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που εκτείνονται στο εξελικτικό δέντρο.

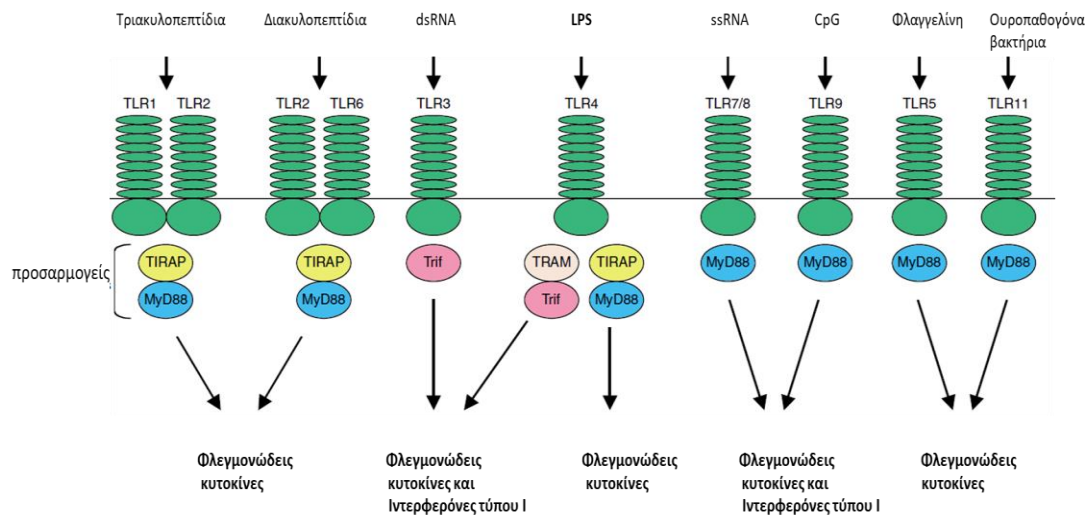
1.4.8.1 Υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

Όπως προαναφέρθηκε, οι TLRs είναι υποδοχείς PRRs της έμφυτης ανοσίας και αναγνωρίζουν διατηρημένες περιοχές μικροβιακής προέλευσης, γνωστές και ως PAMPs. Η αναγνώριση των PAMPs επιτυγχάνεται μέσω των εξελικτικά συντηρημένων υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας, από τους PRRs και οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης (συντηρημένα από τη *Drosophila* στα θηλαστικά) και οι υποδοχείς επάγουν την έκφραση πολλών γονιδίων όπως φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ιντερφερόνες, χημειοκίνες και αντιμικροβιακά πεπτίδια που εμπλέκονται στην άμυνα του οργανισμού και είναι απαραίτητα έναντι του παθογόνου που εισβάλλει (Janeway, 1989). Πολλοί οργανισμοί εκφράζουν υποδοχείς της οικογένειας των TLR, στα θηλαστικά και ως σήμερα έχουν αναφερθεί 13 τύποι

όπου 11 από αυτούς τους υποδοχείς εντοπίζονται και στον άνθρωπο. Οι TLR1, 2, 4, 5, 6 και 10 εκφράζονται σε κυτταρικές επιφάνειες ενώ οι TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 και 13 σε ενδοκυτταρικές περιοχές (ενδοπλασματικό δίκτυο και ενδοσώματα) (Hopkins and Sriskandan, 2005). Ο εντοπισμός των TLRs δεν επιβεβαιώνεται πάντα με καθολικό τρόπο αφού αναφέρεται πως διαφοροποιείται αναλόγως με τον τύπο κυττάρων που συμμετέχουν. Επίσης, είναι καθοριστικής σημασίας ο εντοπισμός των TLRs για το μηχανισμό μεταγωγής του σήματος.

Πιο αναλυτικά, οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και χαρακτηριστικό των υποδοχέων αυτών είναι η εξωκυτταρική περιοχή που διαθέτουν με μια πλούσια δομή σε λευκίνη (Leucine Rich Repeat; LRR) και η οποία αποτελεί τη θέση αναγνώρισης των PAMPs και των DAMPs (Damage-associated molecular patterns), τα οποία προέρχονται από κύτταρα του ξενιστή που έχουν υποστεί ζημιές (Tang *et al.*, 2012). Στην ενδοκυτταρική περιοχή των TLRs υπάρχει ο υποδοχέας TLR-ιντερλευκίνης 1(IL1) (Toll/IL1 receptor; TIR1), ο οποίος παρουσιάζει σημαντική ομολογία με μέλη της οικογένειας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (interleukin 1 receptor;IL1R) και είναι αναγκαίος για τη μεταγωγή σήματος.

Για τη μεταγωγή σήματος μετά τη διέγερση των TLRs, φαίνονται να εμπλέκονται 4 μόρια προσαρμογείς. Τα μόρια αυτά είναι: ο παράγοντας μυελικής διαφοροποίησης 88 (myeloid differentiation primary response protein 88; MyD88, η πρωτεΐνη προσαρμογέας που περιέχει δομή TIR και IFN- β (TIR domain containing adapter inducing interferon β ; TRIF), η πρωτεΐνη προσαρμογέας με δομή TIR (TIR domain containing adapter; TIRAP) και η πρωτεΐνη προσαρμογέας που συσχετίζεται με το TRIF (TRIF-related adapter molecule; TRAM) (Kawai and Akira, 2006). Επιπλέον έχει βρεθεί και ένας προσαρμογέας που πιθανότατα να ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση και είναι γνωστός ως SARM (sterile a and heat b armadillo motif containing proteins) (Carty *et al.*, 2006). Περαιτέρω, στη διαδικασία της σηματοδότησης συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες. Διαφορετικοί TLRs αλληλεπιδρούν με διαφορετικά από αυτά τα μόρια. Ο TLR4 είναι ο μόνος υποδοχέας που αλληλοεπιδρά και με όλα τα παραπάνω μόρια (Jenkins and Mansell, 2010).



Εικόνα 1.3 Σχηματική αναπαράσταση των συνδετών, προσαρμογέων και των τελικών προϊόντων του σηματοδοτικού μονοπατιού των TLRs. (Προσαρμοσμένο από τους Kawai και Akira, 2006)

1.4.9 Τα μονοπάτια σηματοδότησης TLRs

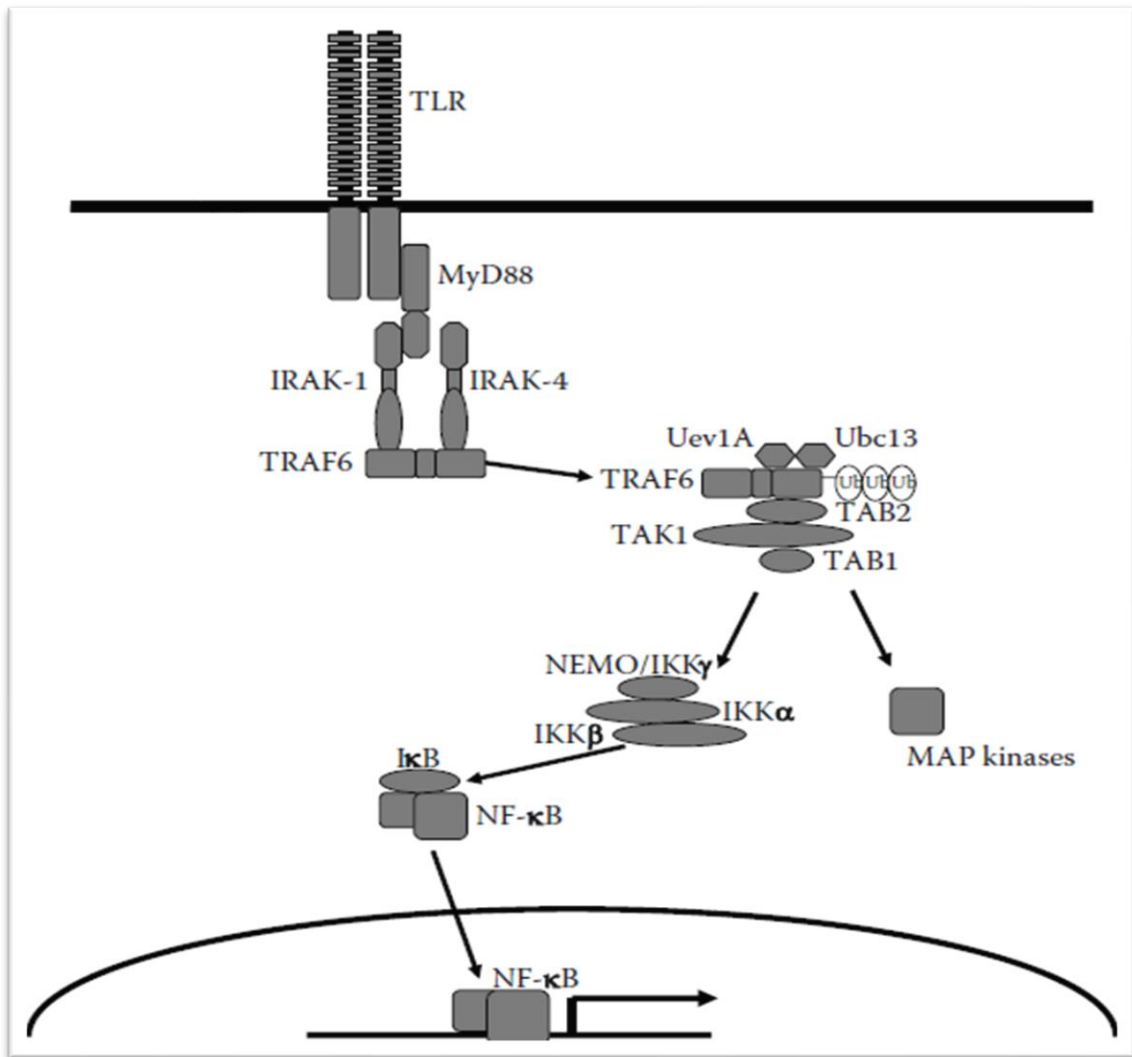
Όπως ήδη αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, για τη διαδικασία εκκίνησης της μεταγωγής σήματος, είναι απαραίτητος ο υποδοχέας TIR και πιο συγκεκριμένα ο διαμερισμός αυτού που οδηγεί στον σχηματισμό δομής TIR-TIR. Εν ολίγοις, αυτή η δομή με τη σειρά της επιστρατεύει τους προσαρμογείς και η επικρατέστερη μορφή TIR προσδένεται στον κατάλληλο υποδοχέα και μεσολαβεί με αυτόν τον τρόπο στο μονοπάτι σηματοδότησης. Συνεπώς, κάθε μέλος της οικογένειας TLRs παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τη δομή, το πρότυπο έκφρασης και τους συνδέτες που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα κατάλληλα μονοπάτια σηματοδότησης (Zheng *et al.*, 2020).

Τα μόρια MyD88 και TRIF ευθύνονται για την ενεργοποίηση διακριτών μονοπατιών σηματοδότησης, καταλήγουν σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο πυρηνικός παράγοντας-κΒ (Nuclear factor-kappa B; NF-κB) και πρωτεΐνη ενεργοποιητής (Activator protein 1; AP-1) καθώς και οι ρυθμιστικοί παράγοντες της ιντερφερόνης (Interferon regulatory factors; IRFs) που οδηγούν σε παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (TNFα, IL1B, IL6 κ.α) και τύπου I IFN (IFN-α και IFN-β), αντίστοιχα (Akira, Uematsu and Takeuchi, 2006).

Τα μονοπάτια σηματοδότησης διακρίνονται σε MyD88 εξαρτώμενα και MyD88 μη εξαρτώμενα.

✚ Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου MyD88 (Εικόνα 1.4)

Ο MyD88 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων IL1R και είναι κοινός προσαρμογέας που εμπλέκεται με όλους τους TLRs, εκτός από τον TLR3. Μετά τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς, ο MyD88 συνδέεται με κινάσες της οικογένειας IRAK (interleukin 1 receptor associated kinase; IRAK). Οι IRAK1 και IRAK4 φωσφορυλιώνονται και από το σύμπλοκο και ενεργοποιούν TRAF6, δηλαδή τον παράγοντα 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; TRAF6) και μαζί με την IRAK1 αλληλεπιδρά με τις λιγάσες ουμπικιτίνης (Ubc13 και Uev1a). Η ουμπικιτίνωση της TRAF6 ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση-1 ενεργοποίησης από τον β αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού, TAK1 (transforming growth factor-β – activated protein kinase 1; TAK1) και οδηγεί στην φωσφορυλίωση του συμπλόκου IKK (IKKα-IKKβ-NEMO/IKKγ) και των μελών της οικογένειας MAP κινασών. Το ενεργό πλέον σύμπλοκο IKK, φωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης της IκB, αναστολέας του NF-κB, όπου απενεργοποιείται μέσω ουμπικιτίνωσης. Με αυτόν τον τρόπο ο NF-κB αποδεσμεύεται και μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα. Αυτή η μετατόπιση έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών. Παράλληλα, οι MAP κινάσες ενεργοποιούν με τη σειρά τους μέσω φωσφορυλίωσης των κινασών JNK (Jun N-terminal kinase; JNK) και p38 τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση του AP-1. Η AP-1, όπως και ο NF-κB, προσδένεται στο DNA επάγοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (TNFα, IL1, IL6) και χημειοκινών (IL8) (Hopkins and Sriskandan, 2005; Kawai and Akira, 2006; Jenkins and Mansell, 2010; Li, Xia and Hu, 2020; Ciesielska, Matyjek and Kwiatkowska, 2021).

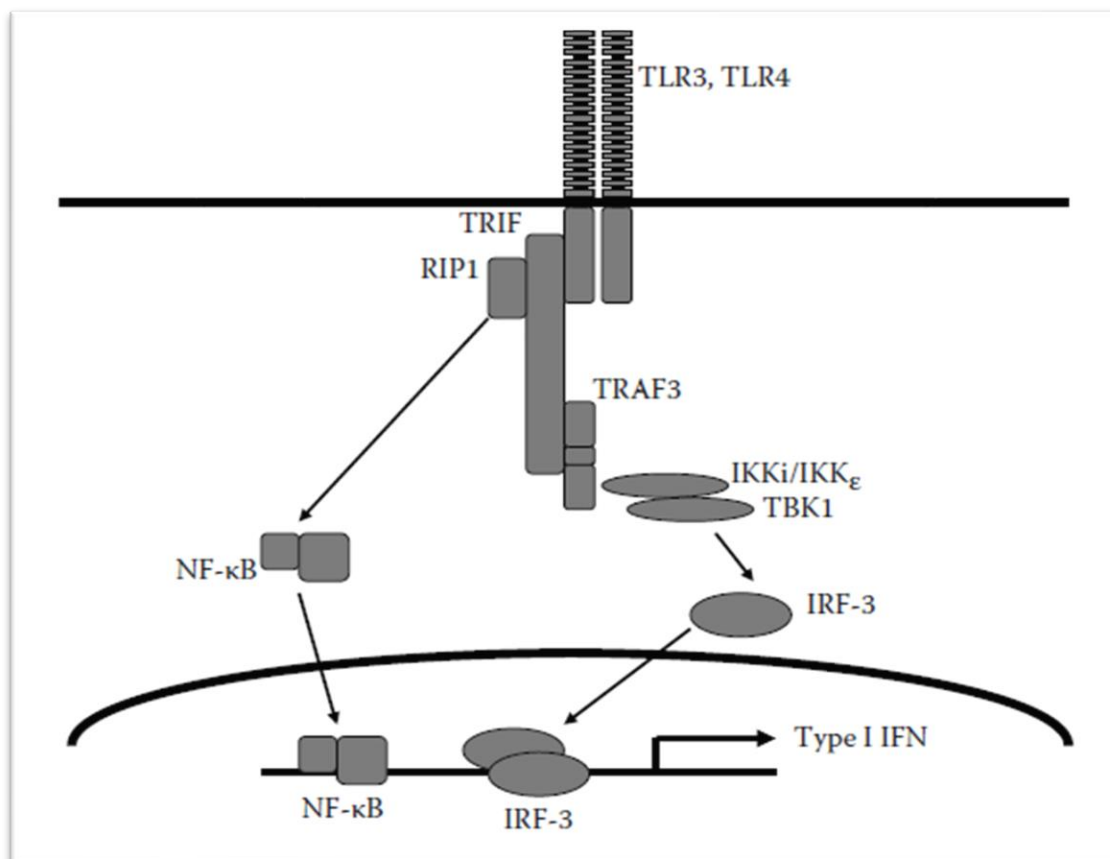


Εικόνα 1.4 MyD88-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs (Προσαρμοσμένο από τους Konat et al., 2008)

🚩 Σηματοδότηση των TLRs μέσω του μορίου TRIF (Εικόνα 1.5)

Η ενεργοποίηση των NF-κB και AP-1 από το TRIF εξαρτώμενο μονοπάτι, αλλιώς MyD88 μη εξαρτώμενο μονοπάτι, εντοπίζεται μόνο για τους υποδοχείς TLR3 και TLR4 και παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 1.5. Ο TLR4 αλληλεπιδρά έμμεσα μέσω του προσαρμογέα TRAM, ενώ ο προσαρμογέας TRIF ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Με την πρόσδεση του PAMP στον TLR, προκαλείται η πρόσδεση της TRIF με την TRAF3. Η TRAF3 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο IKKι/IKKε/TBK1 και το σύμπλοκο με φωσφορυλιώνει τον IRF3, που με τη σειρά του διμερίζεται και μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα επάγοντας την παραγωγή IFNs τύπου I. Ένα ακόμη σηματοδοτικό μονοπάτι είναι η περίπτωση που η TRIF συνεργάζεται με την RIP1 και ενεργοποιεί τον NF-κB. Στην τελευταία περίπτωση, η TRIF ενεργοποιεί

την TRAF6 και το σύμπλοκο αυτό να ενεργοποιήσει την TAK1 και τελικά τον NF-κB μέσα στον πυρήνα, όπως αναλύθηκε για το εξαρτώμενο μονοπάτι MyD88 (Hopkins and Sriskandan, 2005; Kawai and Akira, 2006; Jenkins and Mansell, 2010; Li, Xia and Hu, 2020; Ciesielska, Matyjek and Kwiatkowska, 2021).



Εικόνα 1.5 MyD88-μη εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs (Προσαρμοσμένο από τους Konat *et al.*, 2008)

1.4.10 Χρήση *in vitro* κυτταρικών μοντέλων για μελέτη της ανοσορύθμισης

Η χρήση *in vitro* κυτταρικών σειρών τόσο του μύος (ποντικού) όσο και του ανθρώπου, που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα, υπερτερούν λόγω οικονομικών και ηθικών περιορισμών. Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μονοκύτταρων/μακροφάγων THP-1 όσο και η κυτταρική σειρά μακροφάγων μύος RAW 264.7 χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διερεύνηση της ανοσιακής ρύθμισης με μελέτες που επικεντρώνονται στις λειτουργίες, τους μηχανισμούς και τα μονοπάτια σηματοδότησης των μακροφάγων (Li *et al.*, 2021). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των δύο αυτών κυτταρικών γραμμών έναντι των πρωτογενών μακροφάγων παρατίθενται ως εξής:

- ✚ Είναι εύκολες και ασφαλείς κατά τη χρήση τους καθώς δεν υπάρχουν ενδείξεις για παρουσία μολυσματικών ιών ή τοξικών προϊόντων
- ✚ Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι πολύ μεγαλύτερος από εκείνον που έχουν τα πρωτογενή κύτταρα
- ✚ Έχουν ομοιογενές γενετικό υπόβαθρο που ελαχιστοποιεί το βαθμό μεταβλητότητας όσον αφορά τους φαινοτύπους των μακροφάγων
- ✚ Η διαθεσιμότητα των πρωτογενών κυττάρων είναι περιορισμένη και δεν αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο, σε αντίθεση με την αποθήκευση των καρκινικών κυττάρων και την ανάκτηση τους με καλή βιωσιμότητα έπειτα από μεγάλο χρονικό διάστημα

Ωστόσο, τα πολωμένα μακροφάγα εξακολουθούν να είναι διαφορετικά μεταξύ κυτταρικών σειρών ανθρώπου και μύς. Σε γενικές γραμμές, μπορεί να υπάρξουν απρόσμενες επιδράσεις κατά τη διαδικασία της *in vitro* διαφοροποίησης ή/και ενεργοποίησης των μακροφάγων (Chanput, Mes and Wichers, 2014b). Για παράδειγμα, η αυξημένη έκφραση γονιδίων κατά τη διαφοροποίηση των μακροφάγων, μπορεί να καταπιέσει τις ήπιες επιδράσεις ερεθισμάτων, ιδιαίτερα των βιοενεργών συστατικών που προέρχονται από τρόφιμα ή ακόμη και να προκαλέσουν ευαισθησία στο LPS (Takashiba *et al.*, 1999; E. K. Park *et al.*, 2007). Επίσης, τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων-στόχων και των γειτονικών κυττάρων, όπως είναι στους ιστούς, δεν μπορούν να εντοπιστούν. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στη συν-καλλιέργεια κυτταρικών σειρών με σκοπό να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα (Chanput, Mes and Wichers, 2014b).

Πίνακας 1.3 Χαρακτηριστικά κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν

	<i>THP-1</i>	<i>HT-29</i>	<i>RAW 264.7</i>
Οργανισμός	Homo sapiens	Homo sapiens	Mus musculus
Ιστός	Περιφερικό αίμα (peripheral blood)	παχύ έντερο (colon carcinoma)	Περιφερικό αίμα (peripheral blood)
Μορφολογία	Μονοκύτταρα/μακροφάγα	Επιθηλιακά	Μακροφάγα
Ιδιότητες καλλιέργειας	Σε εναιώρημα (suspension)	Προσκολλημένα (adherent)	Προσκολλημένα (adherent)

1.4.11 Ανοσορυθμιστική δράση γαλακτοκομικών προϊόντων

Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος πιθανώς να οδηγήσει τον οργανισμό σε πολυάριθμες ασθένειες. Η διατροφή είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και για αυτό θεωρείται και παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη παθήσεων. Συνεπώς, η τροποποίηση της διατροφής θα μπορούσε να καθυστερήσει ή να αποτρέψει κάποιες παθήσεις λόγω των συστατικών (πρωτεΐνες, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) που παρέχουν στον οργανισμό. Αποτελεί σημαντική στρατηγική η ρύθμιση του ανοσοποιητικού μέσω της διατροφής καθώς έχει παρόμοια αποτελέσματα με τις αντιβιοτικές θεραπείες αλλά ταυτόχρονα μπορεί να μειωθεί η ανησυχία για την ανθεκτικότητα στα φάρμακα (Cai *et al.*, 2020).

Οι πρωτεΐνες των γαλακτοκομικών προϊόντων, υποπροϊόντων και τα παράγωγα αυτών έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες να παρουσιάζουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες (Haque, Chand and Kapila, 2009). Ορισμένα πεπτίδια έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν ή αναστέλλουν συγκεκριμένες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση, τις πειραματικές συνθήκες που επικρατούν και τη λειτουργία τους στον οργανισμό. Στο σύνολό τους, τέτοιες δραστηριότητες μπορεί να χαρακτηρίζονται στο φάσμα της γενικότερης έννοιας της «ανοσορύθμισης» (Werner *et al.*, 1986). Επιπλέον, ορισμένα βιοενεργά συστατικά ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού και είναι ικανά να τροποποιήσουν ρυθμιστικές λειτουργίες κατά τη διαδικασία της φλεγμονής (Millán-Linares *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, βιοενεργά πεπτίδια του γάλακτος, που προέρχονται είτε από καζεΐνες είτε από τον ορό του γάλακτος, έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με τη διέγερση και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, την φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων, τη σύνθεση των αντισωμάτων καθώς επίσης και με τη ρύθμιση των κυτοκινών (Mohanty *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2020).

Σε μελέτη των Saint *et al.* επισημάνθηκε η ανοσορυθμιστική δράση της απομονωμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein isolate; WPI) και κλασμάτων αυτής που είχε προηγηθεί υδρόλυση της με τρυψίνη/χυμοτρυψίνη. Χορηγήθηκε σε μύες από τη στοματική οδό και ήταν χωρισμένα σε 2 ομάδες, ο μισός πληθυσμός απαρτιζόταν από υγιή άτομα και τα άλλα μισά ήταν μολυσμένα με *E.coli* O157:H7. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε διέγερση της συνολικής παραγωγής IgA, υποδηλώνοντας πως τα προϊόντα της WPI να έχουν πιθανό ανοσοενισχυτικό ρόλο. Στην ίδια μελέτη, μόνο στο μοντέλο με τους μολυσμένους μύες και για το κλάσμα που προέκυψε με pH>7

παρατηρήθηκε αύξηση και των επιπέδων TGFβ, υποδεικνύοντας την αυξημένη ανοσιακή επαγρύπνηση κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Saint-Sauveur *et al.*, 2008). Σε μελέτη των Araujo *et al.*, διερευνήθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του αίγιου ορού γάλακτος σε ένα *in vivo* μοντέλο κολίτιδας σε μύες και σε ένα *in vitro* μοντέλο με κύτταρα ποντικού διεγερμένα με LPS. Ο αίγιος ορός παρεμπόδισε το μονοπάτι σηματοδότησης NF-κB p65 και p38 MAPK που με τη σειρά του μείωσε την έκφραση αρκετών προφλεγμονωδών μορίων, όπως τις IL1β, IL6, IL17 TNFα, MMP9 και ICAM. (*in vivo* μοντέλο). Επίσης, στα LPS διεγερμένα κύτταρα σημειώθηκαν μειωμένα επίπεδα της IL6 και του NO (Araújo *et al.*, 2017).

Σε προηγούμενη μελέτη αναφέρεται η ανοσορυθμιστική δράση του ζυμωμένου γαλακτοκομικού προϊόντος, του κεφίρ. Το κεφίρ καθώς και το παστεριωμένο κεφίρ ήταν σε θέση να ρυθμίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου των ποντικών, μέσω απόκρισης Th1 και Th2 κυτοκινών, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Vinderola *et al.*, 2005). Έπειτα, η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε την ανοσορυθμιστική δράση δύο κλασμάτων του κεφίρ (στερεό και υπερκείμενο κλάσμα), μελετώντας περαιτέρω τις κυτοκίνες που παράγονται από κύτταρα της έμφυτης ανοσιακής απόκρισης, διαπιστώνοντας τη μείωση της ρύθμισης του Th2 φαινοτύπου (Vinderola *et al.*, 2006). Οι Beaulieu *et al.* επισήμαναν τη χρήση ζυμωμένου προϊόντος με ορό γάλακτος να εμφανίζει υψηλότερες ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες σε σύγκριση με άλλα εμπορικά σκευάσματα είτε ορού είτε γάλακτος. Αυτό το ζυμωμένο προϊόν προάγει την αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, ειδικά των μονοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων σε επίμυες (Beaulieu *et al.*, 2007).

Τα βιοενεργά πεπτίδια των γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζουν ανοσορυθμιστικές ιδιότητες επιδρώντας στο ανοσοποιητικό σύστημα (Santiago-López *et al.*, 2016). Τα πεπτίδια που προέρχονται από το γάλα αποτελούνται από 2-20 αμινοξέα και απελευθερώνονται από τη μητρική πρωτεΐνη με ενζυμική υδρόλυση, πρωτεόλυση και ζύμωση στον πεπτικό σωλήνα (Cai *et al.*, 2020). Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν ενδείξεις *in vivo*, όπου τα προερχόμενα από το γάλα πεπτίδια, να εντοπίζονται στη γαστρεντερική οδό και στην κυκλοφορία του αίματος του ανθρώπου (Chabance *et al.*, 1998; Caira *et al.*, 2016), με μικρό πλήθος ατόμων (n<10) να είναι το δείγμα της εκάστοτε μελέτης.

Σε μελέτη των Caccano *et al.* αναφέρεται πως η Lf επιδεικνύει ανοσορυθμιστικές λειτουργίες, μειώνοντας την ελευθέρωση των IL1, IL12 και TNF α και ενισχύοντας την κυτταροτοξικότητα των μονοκυττάρων και των NK-κυττάρων (Caccano *et al.*, 2002). Επίσης, η LFc_{in} B, θραύσμα της βόειας Lf f (17-41) που προέκυψε από υδρόλυση με πεψίνη, πιθανόν να ενισχύει την φαγοκυτταρική ικανότητα των ανθρώπινων ουδετερόφιλων μέσω της άμεσης δέσμευσης που παρατηρείται με αυτά τα κύτταρα (Miyauchi *et al.*, 1998).

Το GMP, θραύσμα που αποτελείται από 64 αμινοξέα και προέρχεται από βόεια κ-CN f (106-169), φαίνεται να ενισχύει την φαγοκυτταρική δραστηριότητα και πολλαπλασιασμό των μακροφάγων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά U937 (Li and Mine, 2004). Παρόμοια αποτελέσματα σε μεταγενέστερη μελέτη παρουσιάζει το GMP να επάγει την έκφραση διάφορων κυτοκινών, όπως της IL1 β , IL8 και TNF α μέσω σηματοδότησης NF- κ B και MAPK σε THP-1 κύτταρα (Requena *et al.*, 2009).

Σε μοριακό επίπεδο, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός ορισμένων ειδικών μηχανισμών, όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος καθώς και των αντίστοιχων υδρολυμάτων τους, όπου είναι ικανοί να ενεργοποιούν TLRs, σημαντικών υποδοχέων της ανοσιακής σηματοδότησης, καθώς ανήκουν στην οικογένεια PRRs, όπως έχει ήδη αναλυθεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Πιο συγκεκριμένα, τα προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών του ορού ενεργοποιούν πολλαπλούς TLRs (TLR2,-3,-4,-6,-7,-8 και -9) και αυτό προκαλεί την παραγωγή TNF α , IL10 και IL8 σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells;PBMCs) και THP-1 κύτταρα (Kiewiet *et al.*, 2017). Σε αντίθεση, τα προϊόντα υδρόλυσης των καζεϊνών παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των TLRs, γεγονός που αποδεικνύει πως η πηγή πρωτεΐνης είναι καθοριστικής σημασίας για τις τελικές επιδράσεις που αποτυπώνονται (Kiewiet *et al.*, 2018a).

Σε παλαιότερη μελέτη των Iskandar *et al.* γίνεται αναφορά για ένα υδρόλυμα (υπό συνθήκες υπερβαρικής πίεσης) ορού γάλακτος (με πεψίνη και παγκρεατίνη), το οποίο παρουσίασε βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση (με τη μέθοδο FRAP) και την ίδια στιγμή ήταν σε θέση να καταστείλει την επαγόμενη παραγωγή IL8 σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές του αναπνευστικού συστήματος ενεργοποιημένες με LPS, πιθανότατα μέσω της δέσμευσης στον TLR4 (Iskandar *et al.*, 2015). Ποικίλες *ex vivo*

ανοσιακές επιδράσεις εντοπίστηκαν σε υδρολυμένα κλάσματα της β-Lg, σε αντίθεση με την υδρολυμένη, μη κλασματοποιημένη β-Lg όπου απουσίαζαν. Πιο συγκεκριμένα, το κλάσμα που περιείχε μακροπεπτίδια ήταν ικανό να επάγει Th1 αποκρίσεις, ενώ το κλάσμα που περιείχε βραχέα πεπτίδια συνδεόταν με την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων αυξάνοντας την έκκριση TNFα (Rodríguez-Carrío *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, τόσο στη β-Lg όσο και στο τετραπεπτίδιο IPAV f(94-97), που είχε προηγηθεί υδρόλυση με προνάση, ταυτοποιήθηκε να έχει αντιφλεγμονώδη δράση σε διεγερμένα κύτταρα Caco-2 από TNFα, περιορίζοντας την παραγωγή της IL8 μέσω NF-κB και MAPK μονοπατιών σηματοδότησης (Oyama *et al.*, 2017).

Η έκθεση συμπυκνώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein concentrate; WPC), που είχε υποστεί χαμηλή θερμική επεξεργασία, σε επιθηλιακή εντερική κυτταρική σειρά χοίρου, σημείωσε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της ανοσοαπόκρισης. Πιο συγκεκριμένα, η Lf και ο TGFB2 διατηρήθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης σε σχέση με το WPC (Nguyen *et al.*, 2016). Η έκθεση γλυκωμένου (glycated) WPC (δημιουργήθηκε με μια μη ενζυματική διαδικασία Maillard) δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στα RAW 264.7, ταυτόχρονα αύξησε την έκφραση αρκετών προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNFα, IL1 και IL6 καθώς και τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (Chun *et al.*, 2016).

Οι Mao *et al.* παρατήρησαν πως προϊόν υδρόλυσης καζεϊνών (προερχόμενο από γάλα γιακ) παρουσίασε σημαντική μείωση παραγωγής του ενζύμου NO καθώς και των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL1β, IL6 και TNFα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε διεγερμένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα μυός (Mao *et al.*, 2011). Σε παρόμοια μελέτη, οι Toorcham *et al.* μελέτησαν την ανοσορυθμιστική δράση υδρολύματος καζεΐνης σε THP-1 κύτταρα, ενεργοποιημένα με LPS και παρατήρησαν μείωση στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL1β, IL6, IL8, TNFα και του ενζύμου COX2 (Toorcham *et al.*, 2017). Σε παλαιότερη μελέτη, οι Ma *et al.* ανέφεραν πως ο εγκλωβισμός συμπυκνωμένου υδρολύματος πρωτεΐνης του ορού του γάλακτος σε μικροκάψουλα ενίσχυσε σημαντικά τη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων μυών (Ma *et al.*, 2014).

Σε ανασκόπηση των Diaz γίνεται αναφορά στα υδρολύματα πρωτεϊνών και πεπτιδίων που προέρχονται από το γάλα και στη συνολική ανοσορυθμιστική τους δράση. Αξιοσημείωτη είναι η ανοσορυθμιστική δράση των υδρολυμάτων με ή χωρίς την

παρουσία ζωντανών ωφέλιμων βακτηρίων καθώς και η *de novo* παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων κατά τη φυσική διαδικασία της ζύμωσης στον εντερικό σωλήνα (Reyes-Díaz *et al.*, 2018).

1.5 Αντιυπερτασικές ιδιότητες

1.5.1 Εισαγωγή

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αντιπροσωπεύουν το 1/3 των θανάτων παγκοσμίως και υπερβαίνουν τα 17 εκατομμύρια ετησίως ('A global brief on Hyper tension', 2013). Η υπέρταση, η επίμονη αύξηση της αρτηριακής πίεσης πάνω από 140/90 mm Hg (συστολική/διαστολική αρτηριακή πίεση, αντίστοιχα), αποτελεί ένας από τους βασικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD) και είναι μία βασική αιτία θνησιμότητας στις αναπτυσσόμενες και ανεπτυγμένες χώρες (Rai, Sanjukta and Jeyaram, 2017). Η υπέρταση συχνά αποκαλείται ως « σιωπηλός δολοφόνος» που επηρεάζει πάνω από 1 δισεκατομμύριο παγκοσμίως. Η εμφάνιση πρώιμων συμπτωμάτων για την υπέρταση είναι σπάνια, και ακόμη και αν διαγνωστεί έγκαιρα, δύσκολα αντιμετωπίζεται επαρκώς. Είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για αθηροσκλήρωση, στεφανιαία νόσο, εγκεφαλικό επεισόδιο και νεφρική νόσο (Lin, Lv and Li, 2012). Η Ελλάδα δεν αποτελεί εξαίρεση, με σχεδόν το 40 % του ενήλικου πληθυσμού να υποφέρει από υπέρταση, με ένα σημαντικό ποσοστό να αγνοεί την ύπαρξη της και να μην είναι εφικτή η αντιμετώπισή της υπέρτασης (Athanasakis *et al.*, 2014). Παρά τις προσπάθειες που καταβάλλονται για τη μείωση των ατόμων που πάσχουν από υπέρταση, στατιστικές μελέτες δείχνουν να παραμένει αμετάβλητος ο πληθυσμός που υποφέρει από καρδιαγγειακά νοσήματα μεταξύ του 2010 μέχρι και σήμερα. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του αλκοόλ, του καπνού, της χρήσης ουσιών και της παχυσαρκίας, που αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την υπέρταση (Okagu *et al.*, 2022). Επιπρόσθετα, τα φαρμακευτικά αντιυπερτασικά φάρμακα έχουν συνδεθεί με ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως πονοκέφαλο και βήχα, με αποτέλεσμα πολλοί ασθενείς να ελέγχουν στοιχειωδώς την αρτηριακή τους πίεση και να βρίσκονται σε κίνδυνο ακόμη και με τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής λόγω των επιπλοκών (Majumder, Mine and Wu, 2016). Ως εκ τούτου, απαιτούνται επείγοντως νέες, οικονομικά αποδοτικές και αποτελεσματικές θεραπευτικές στρατηγικές για την καλύτερη διαχείριση της υπέρτασης σε παγκόσμιο επίπεδο.

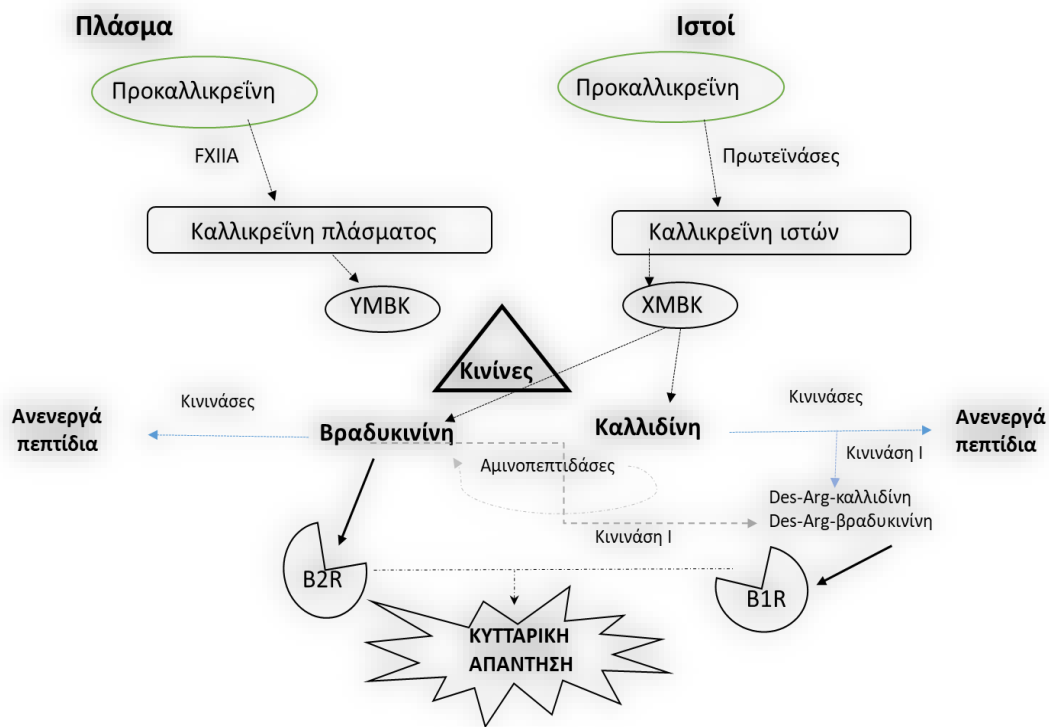
1.5.2 Συστήματα ρύθμισης αρτηριακής πίεσης

Τα συστήματα ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης λειτουργούν σε βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη βάση. Η ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος διαδραματίζει αξιόλογο ρόλο στην παθογένεση αρκετών καρδιαγγειακών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης και της υπέρτασης. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη συμπαθητική ενεργοποίηση και οι μηχανισμοί που μεσολαβούν στη νευρικά επαγόμενη υπέρταση παραμένουν ασαφείς (Lohmeier, 2001). Κατά κύριο λόγο, αυτό οφείλεται στη δυσκολία αξιολόγησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος κάτω από χρόνιες καταστάσεις. Συνεπώς, μία υπόθεση που γίνεται εσφαλμένα σε μελέτες, είναι η επεξήγηση της οξείας παρατήρησης και η αναγωγή των εμπλεκόμενων νευρικών μηχανισμών σε μακροπρόθεσμες συνθήκες. Ωστόσο, μελέτες επισημαίνουν πως ο σύνδεσμος μεταξύ βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης ρύθμισης είναι τα συμπαθητικά νεύρα των νεφρικών αρτηριών (DiBona, 2004). Το σύστημα καλλικρεΐνης-κινίνης (kallikrein-kinin; K-K-Σ) και ρενίνης-αγγειοτενσίνης (renin-angiotensin; P-A-Σ) αλληλεπιδρούν σε πολλά επίπεδα.

1.5.2.1 Σύστημα καλλικρεΐνης-κινίνης

Ο φυσιολογικός ρόλος του συστήματος καλλικρεΐνης-κινίνης δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς καθώς ο τρόπος που οι πρωτεΐνες αυτού του πρωτεολυτικού συστήματος ενεργοποιούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες όταν συγκεντρώνονται στον ενδοαγγειακό χώρο παραμένει άγνωστος (Schmaier, 2003). Οι κινίνες είναι ισχυρά αγγειοχαλαρωτικά πεπτίδια, παράγονται κατά την αρτηριακή και φλεβική κυκλοφορία και συμβάλλουν σημαντικά στην ομοιοστάση του οργανισμού. Αυτό συντελείται μέσω της διούρησης και νατριούρησης με τη δράση των νεφρών, της αυξημένης ροής αίματος στα νεφρά, της αγγειοδιαστολής και υπότασης (Rhaleb, Yang and Carretero, 2011). Είναι ολιγοπεπτίδια που περιέχουν την αλληλουχία αμινοξέων της βραδυκινίνης, παράγονται από πρόδρομες ουσίες γνωστές ως κινινογόνα με τη βοήθεια κινινογενασών όπως η καλλικρεΐνη του πλάσματος και των ιστών. Οι κινίνες είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεση φλεγμονωδών ασθενειών και να δρουν στην έμφυτη ανοσία ως διαμεσολαβητές της φλεγμονής προάγοντας την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία ενεργοποιούν το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα με μηχανισμούς που προάγουν τη φλεγμονή. Ωστόσο, οι κινίνες που δρουν μέσω του νιτρικού οξέος (nitric oxide; NO) συμβάλλουν στην αγγειακή προστατευτική δράση των αναστολέων ACE (Angiotensin converting enzyme; ACE). Συνολικά, ο

ρόλος των κινινών κατά την υπέρταση παραμένει αμφιλεγόμενος. Συνοπτικά παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1.2 το σύστημα καλλικρεΐνης-κινίνης (Κ-Κ-Σ).



Διάγραμμα 1.2 Συνοπτική απεικόνιση του συστήματος Κ-Κ-Σ (Προσαρμοσμένο από τους Pathak et al. 2014)

Οι πεπτιδάσες εκκρίνονται ως ζυμογόνα και ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική διάσπαση. Η καλλικρεΐνη του πλάσματος (γονίδιο *KLKB1*) ενεργοποιείται από τον παράγοντα πήξης *XIIIa* (*FXIIIa*). Δρουν με τα υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνα (*YMBK* και *XMBK*) για την παραγωγή βραδυκινίνης και καλλιδίνης αντίστοιχα, οι οποίες δρουν μέσω του υποδοχέα *B2* (*B2R*). Η βραδυκινίνη παράγεται από την καλλιδίνη με τη δράση αμινοπεπτιδασών. Τα πεπτίδια αυτά μπορούν να μετατραπούν σε *des-Arg* μεταβολίτες από τις κινινάσες *I* (καρβοξυπεπτιδάσες). Οι *des-Arg* κινίνες συνδέονται με τον υποδοχέα *B1* (*B1R*). Οι κινίνες αδρανοποιούνται άμεσα κυρίως από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (*ACE*; *angiotensin converting enzyme*; κινινάση *II*). Η διέγερση του *B* υποδοχέα μέσω των κινινών εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως είναι ο έλεγχος της αρτηριακής πίεσης, της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών και της φλεγμονής.

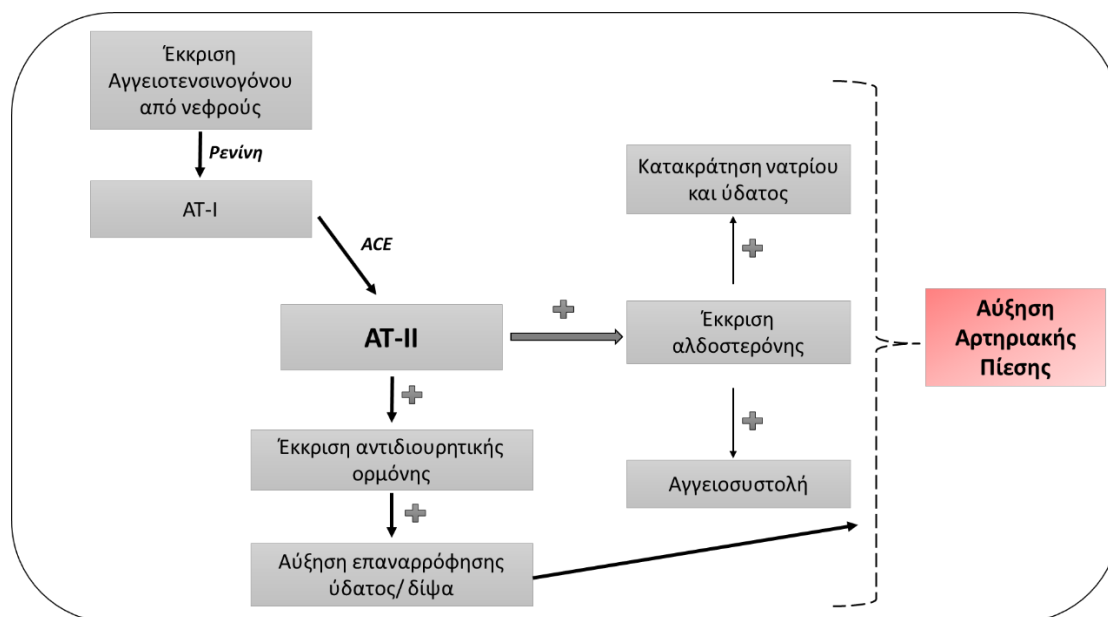
1.5.2.2 Σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (P-A-Σ) έχει απασχολήσει τη διεθνή επιστημονική κοινότητα για περισσότερο από έναν αιώνα για την ολοκληρωμένη κατανόηση του υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών για την αντιμετώπιση της απορρυθμισής του (Ferrario and Salem, 2006). Το P-A-Σ κατέχει σημαντικό ρόλο στην καρδιαγγειακή φυσιολογία μέσω της επίδρασής του τόσο για την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης όσο και για την ισορροπία ηλεκτρολυτών (Paz Ocaranza *et al.*, 2020) και αποτελεί το «κλασικό μονοπάτι» P-A-Σ. Ωστόσο, σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις η λειτουργία του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης εντείνεται με αποτέλεσμα να προκαλείται φλεγμονή προάγοντας διάφορες καρδιαγγειακές βλάβες («αντιρυθμιστικό μονοπάτι» P-A-Σ).

Στο «κλασικό μονοπάτι» P-A-Σ, το αγγειοτενσινογόνο (α-γλυκοπρωτεΐνη) απελευθερώνεται από το ήπαρ και διασπάται από τη ρενίνη. Η ρενίνη είναι ένζυμο που παράγεται από συγκεκριμένα κύτταρα της νεφρικής παρασπειραματικής συσκευής, εκκρίνεται στη κυκλοφορία του αίματος και σχηματίζει το δεκαπεπτίδιο αγγειοτενσίνη I (AT-I). Στη συνέχεια, η AT-I μετατρέπεται στο αγγειοσυσταλτικό οκταπεπτίδιο, αγγειοτενσίνη II (AT-II) στο πλάσμα του αίματος μέσω της δράσης του μετατροπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme ή ACE) και αποσπώντας ένα διπεπτίδιο (Paul, Mehr and Kreutz, 2006). Το ACE είναι μια μεταλλοπεπτιδάση (διπεπτιδυλο-καρβοξυ-πεπτιδάση), εξαρτώμενη από το ψευδάργυρο, ικανή να διασπάσει το καρβοξυλικό άκρο (C-τελικό άκρο) ολιγοπεπτιδίων. Συναντάται σε πολλούς ιστούς και βιολογικά υγρά του οργανισμού και έχει ένα ευρύ φάσμα πρόσδεσης υποστρωμάτων. Η πρόσδεση του ACE επιτυγχάνεται μέσω των δύο άκρων του και με μεταβλητή συνάφεια ως προς τα υποστρώματα ή/και τους αναστολείς του (Tomovska *et al.*, 2013). Η AT-II δεσμεύεται σε υποδοχείς που βρίσκονται σε ιστούς σε όλο το σώμα και προκαλεί φυσιολογικές αντιδράσεις που οδηγούν σε συστολή των αιμοφόρων αγγείων, διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα την πίεση του αίματος. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις, οι υψηλές συγκεντρώσεις της (AT)-II οδηγούν σε σοβαρές συστολές των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα την υψηλή αρτηριακή πίεση. Τέλος, η AT-II προκαλεί και την έκκριση της αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια η οποία προκαλεί κατακράτηση νατρίου και ύδατος (Peters, 2012).

Επιπλέον, το ένζυμο ACE αδρανοποιεί το ισχυρά αγγειοδιασταλτικό εννεαπεπτίδιο βραδυκινίνη που ασκεί αντιυπερτασική δράση. Ωστόσο, η σημασία της βραδυκινίνης

έχει γίνει πιο ξεκάθαρη τα τελευταία 25 χρόνια (Taddei and Bortolotto, 2016). Ο μεταβολισμός της βραδυκινίνης σε ένα ανενεργό πεπτίδιο μπορεί να γίνει και στις δύο ομόλογες καταλυτικές περιοχές του ACE, ενώ η διάσπαση της AT-I σε AT-II συμβαίνει κυρίως στο καρβοξυλικό τελικό άκρο του ACE (Bernstein *et al.*, 2011). Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται πως το ένζυμο ACE διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω του Ρ-Α-Σ και Κ-Κ-Σ. Συνοπτικά παρουσιάζεται στο διάγραμμα 1.3 το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Ρ-Α-Σ).



Διάγραμμα 1.3 Συνοπτική απεικόνιση του συστήματος Ρ-Α-Σ (Προσαρμοσμένο από τους Zain *et al.*, 2014)

ACE: Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, AT-I: Αγγειοτενσίνη I, AT-II: Αγγειοτενσίνη-II. Ο σταυρός (+) δηλώνει την αύξηση.

1.5.3 Ρύθμιση και θεραπεία της υπέρτασης

Η πρόληψη της υψηλής αρτηριακής πίεσης συμβάλλει στη διατήρηση των επιπέδων της στα φυσιολογικά επίπεδα, η οποία θα πρέπει να είναι κάτω από 120/80 mm Hg για ενήλικα υγιή άτομα (Maseli *et al.*, 2017). Οι δύο σημαντικοί άξονες που σχετίζονται με ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης είναι η υιοθέτηση υγιεινού τρόπου ζωής και η αγωγή μέσω φαρμάκων.

1.5.3.1 Αλλαγές στον τρόπο ζωής

Ο τρόπος ζωής είναι καθοριστικός παράγοντας τόσο για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης, της αποτροπής ή καθυστέρησης εμφάνισης της υπέρτασης καθώς και της μείωσης των πιθανοτήτων καρδιαγγειακού επεισοδίου. Ο περιορισμός του αλκοόλ

(Kodavali and Townsend, 2006), η διακοπή του καπνίσματος (Madika and Mounier-Vehier, 2017), η μείωση πρόσληψης νατρίου στη διατροφή (Polychronopoulou, Braconnier and Burnier, 2019) καθώς και η καθολική ισορροπημένη διατροφή (Naude *et al.*, 2014) και άσκηση (Smith and Ainslie, 2017) έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αρτηριακής υπέρτασης.

1.5.3.2 Φαρμακευτική αγωγή

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες φαρμάκων για τη θεραπεία της υπέρτασης που χορηγούνται σε άτομα που διατρέχουν κίνδυνο. Μερικές από τις πλέον σημαντικές κατηγορίες φαρμάκων είναι:

- ✚ Τα θειαζιδικά διουρητικά (Vm *et al.*, 2014)
- ✚ Οι ανταγωνιστές διαύλων ασβεστίου της διυδροπυριδίνης (Elliott and Ram, 2011)
- ✚ Οι αναστολείς β-αδρενεργικών υποδοχέων (Poirier and Lacourcière, 2012)
- ✚ Οι αναστολείς του ACE π.χ. καπτοπρίλη, βεναζεπρίλη, εναλαπρίλη, περινδοπρίλη, ραμιπρίλη, λισινοπρίλη (Henda *et al.*, 2013; S. Ye *et al.*, 2022)

Η αντιυπερτασική δράση των προαναφερθέντων φαρμάκων είναι ισχυρή και αποτελεσματική αλλά υπάρχουν πιθανές αντενδείξεις και περιορισμοί λήψης αυτών. Τέλος, έχουν αρκετές παρενέργειες όπως αυξημένα λιπίδια στο αίμα, κατακράτηση νερού και νατρίου, πρήξιμο, ίλιγγο κ.α. (Cao *et al.*, 2021). Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί σε εύρεση αναστολέων του ACE από φυσικά τρόφιμα (Li *et al.*, 2023), όπου και αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

1.6 Αναστολείς του ACE

1.6.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, με τον όρο «λειτουργικά» τρόφιμα (functional foods ή nutraceuticals), χαρακτηρίζονται όλα εκείνα τα φυσικά ή εμπλουτισμένα τρόφιμα, τα οποία έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε μία ή περισσότερες λειτουργίες του οργανισμού, πέρα από αυτή της βασικής διατροφής. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα αναλυθούν πρωτεΐνες, υδρολύματα καθώς και πεπτίδια τροφίμων με πιθανή αντιυπερτασική δράση (food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides). Επιλέγονται έναντι των συνθετικών φαρμάκων λόγω της βιολειτουργικότητας και της φυσικής τους προέλευσης (Kaur *et al.*, 2021). Έχει σημειωθεί πως τα πεπτίδια που προέρχονται από τρόφιμα είναι ασφαλή και οι καταναλωτές τείνουν να προτιμούν

αυτήν την προσέγγιση των φυσικών αντιυπερτασικών έναντι των φαρμάκων για πρόληψη ή για μείωση καρδιαγγειακών παθήσεων, παχυσαρκία και stress (Pihlanto, 2011; Ejike *et al.*, 2017)

Το ACE είναι μία διπεπτιδυλ-καρβοξυπεπτιδάση (EC 3.4.15.1) που περιέχει ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο του και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω των συστημάτων που εμπλέκεται (K-K-Σ και P-A-Σ). Είναι γνωστό πως αναστολείς του ACE μειώνουν την υπέρταση και πιθανότατα να προστατεύουν τον οργανισμό από καρδιαγγειακές παθήσεις (Pihlanto, 2011). Σε γενικές γραμμές, τα ανασταλτικά πεπτίδια του ACE είναι μικρής αλυσού πεπτίδια που φέρουν υδρόφοβα (αρωματικά ή διακλαδισμένης αλυσίδα) υπολείμματα αμινοξέων, όπως είναι η προλίνη.

1.6.2 *In vivo* μελέτες αντιυπερτασικών ιδιοτήτων γαλακτοκομικών προϊόντων

In vivo μελέτες, σε ζώα και σε ανθρώπους, έχουν εντοπίσει πως υπάρχει αντιυπερτασική δράση αναφορικά με το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι Quirós *et al.* παρατήρησαν μείωση της αντιυπερτασικής δράσης (με μείωση της αρτηριακής πίεσης) σε υπερτασικούς επίμυες και υπερτασικά άτομα μετά από κατανάλωση ζυμούμενων υδρολυμάτων πρωτεΐνης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Χρησιμοποιήθηκαν 2 πεπτίδια, τα LHLPLP και LVYFPFGPIPNQLPQNIIP, (β -CN f(133-138) και β -CN f(58-76) αντιστοίχως), τα οποία είχαν διάμεση ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀) με τιμές κάτω από 5 μ M και τα οποία είχαν εντοπιστεί με *in vitro* αντιυπερτασική δράση από προηγούμενες μελέτες (Quirós *et al.*, 2009). Επίσης, οι Foltz *et al.* εντόπισαν αντιυπερτασική δράση *in vivo* που αφορά την ενσωμάτωση των πεπτιδίων Ile-Pro-Pro (αλλιώς IPP) και Leu-Pro-Pro (αλλιώς LPP) σε προϊόν γιαουρτιού. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στο πλάσμα ανιχνεύθηκαν σε πικομοριακές συγκεντρώσεις, όταν χορηγήθηκε ρόφημα γιαουρτιού εμπλουτισμένου με τα βιοενεργά αυτά πεπτίδια (Ile-Pro-Pro και Leu-Pro-Pro) αυξήθηκαν σημαντικά σε νανομοριακές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε πως η ταυτόχρονη λήψη εμπλουτισμένου γιαουρτιού και ενός γεύματος αύξησε περαιτέρω τις συγκεντρώσεις του Ile-Pro-Pro στο πλάσμα (Foltz *et al.*, 2007).

Ακόμη μία μελέτη αναφέρει πως κατά τη ζύμωση αποβουτυρωμένου γάλακτος με *Lactobacillus helveticus* απελευθερώνονται από τις πρόδρομες πρωτεΐνες β -και κ -CN,

τα βιοενεργά τριπεπτίδια Val-Pro-Pro (αλλιώς VPP) και Ile-Pro-Pro αντιστοίχως με αντιυπερτασική δράση. Σημαντική μείωση ($p < 0,01$) της αρτηριακής πίεσης σημειώθηκε σε υπερτασικούς επίμυες μετά από γαστρική διασωλήνωση με τα τριπεπτίδια Val-Pro-Pro και Ile-Pro-Pro στις 8 και 4 ώρες, αντίστοιχα (Pan, Luo and Tanokura, 2005). Οι Sawada *et al.* επισήμαναν πως η χορήγηση του τριπεπτιδίου VPP, δρώντας ως παρεμποδιστής του ACE, ανέστειλε τη συσσώρευση και την ενεργοποίηση των μακροφάγων στους λιπώδεις ιστούς σε παχύσαρκους ποντικούς (Sawada *et al.*, 2015).

Οι Glazunova *et al.* παρατήρησαν σημαντική αντιυπερτασική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε επίμυες, για γάλα που είχε ζυμωθεί με δύο στελέχη (*Lb. delbrueckii* και *Lc. lactis*). Επιπλέον, εντοπίστηκαν βελτιωμένοι διατροφικοί δείκτες που σχετίζονται με τη σύσταση των λιπαρών οξέων καθώς και μείωση της συνολικής χοληστερόλης σε επίμυες ύστερα από συχνή κατανάλωση με γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με *Lb.delbrueckii* (Glazunova *et al.*, 2022). Επιπρόσθετα, σημειώθηκε σημαντική μείωση της αρτηριακής πίεσης σε επίμυες SHR με δόσοεξαρτώμενο τρόπο χορήγησης συμπυκνωμένου υδρολύματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Η δόση 400 mg/kg οδήγησε σε μείωση -47.8 mm Hg της αρτηριακής πίεσης σε σχέση με το μάρτυρα και σε σύγκριση με προηγούμενη μελέτη των ίδιων ερευνητών που σημειώθηκε ελάττωση σε -21 mm Hg (Hussein *et al.*, 2020).

Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει πως η *in vitro* αναστολή του ACE δεν υποδηλώνει από μόνη την την *in vivo* αντιυπερτασική δράση ενός συστατικού και δεν μπορεί να είναι αποκλειστικό κριτήριο αξιολόγησης. Πιο συγκεκριμένα, οι Bernabucci *et al.* επισήμαναν ανασταλτική δράση του ACE σε δείγματα τυριών Grana Padano (Γκράνα Παντάνο) και Parmigiano Reggiano (Παρμιτζιάνα Ρετζιάνο), είτε ήταν λυοφιλιωμένα είτε στα αντίστοιχα δείγματα μετά από *in vitro* γαστρεντερική πέψη. Στην ίδια μελέτη, τα λυοφιλιωμένα δείγματα τυριών χορηγήθηκαν *in vivo* σε 20 επίμυες (spontaneously hypertensive rats) χωρίς να είναι ικανά να ρυθμίσουν τη συστολική και τη διαστολική αρτηριακή πίεση ύστερα από 10 εβδομάδες (Bernabucci *et al.*, 2014). Σε παλαιότερη μελέτη από τους. Στόχος της μελέτης των Fekete *et al.* ήταν η μετα-ανάλυση δεδομένων (ως το 2015) από σχετικές τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (RCT) που αφορούν μελέτες με αντικείμενο τα προαναφερθέντα λακτοτριπεπτίδια σε συνδυασμό με την αρτηριακή πίεση σε ενήλικο πληθυσμό χωρίς ωστόσο τα συμπεράσματα να είναι σαφή (Fekete, Ian Givens and Lovegrove, 2015).

1.6.3 Βρεφικές τροφές

Καθοριστική περίοδος της ζωής κρίνονται οι πρώτοι μήνες μετά τη γέννηση ενός νεογνού όπου συμβαίνουν δραματικές φυσιολογικές αλλαγές όπως η εγκατάσταση της μικροχλωρίδας και η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς, για τον καλύτερο έλεγχο αυτών των αλλαγών είναι απαραίτητη η παρακολούθηση της συμπεριφοράς της τροφής στο γαστρεντερικό σωλήνα του νεογνού. Το βρεφικό γάλα σε παρασκεύασμα (infant formula) είναι η μονή τροφή για το νεογνό, αν ο θηλασμός δεν είναι εφικτός (Bouzerzour *et al.*, 2012). Για αυτό, τα παρασκευάσματα αυτά σχεδιάζονται ούτως ώστε το περιεχόμενο και η απόδοσή τους να προσομοιώνεται επαρκώς με το μητρικό γάλα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος αλλεργίας στο αγελαδινό κυρίως γάλα, αυτά τα προϊόντα παρασκευάζονται από υδρολύματα πρωτεΐνης γάλακτος.

Ο ρόλος των ανασταλτικών πεπτιδίων του ACE στη φυσιολογία του νεογνού δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς μέχρι σήμερα, ωστόσο ενδέχεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση καρδιαγγειακών νόσων στα επόμενα χρόνια της ζωής του. Σε μελέτη των Wada *et al.* αναφέρεται πως τα ανασταλτικά πεπτιδία του ACE που προκύπτουν από το γάλα συνδέονται άμεσα με φυσιολογικά οφέλη για το νεογνό (Wada *et al.*, 2017). Οι ίδιοι είχαν αναφέρει σε προηγούμενη μελέτη πως το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης ενδέχεται να συνδέεται με τους μηχανισμούς που ελέγχουν την πρόωμη ανάπτυξη. Έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ACE και του βάρους γέννησης, με υψηλότερη δραστηριότητα του ACE σε βρέφη με χαμηλό βάρος γέννησης, όπου αυτό αντανακλά ως ένας αντισταθμιστικός παράγοντας για την ανάπτυξη τους. Επομένως, η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού σχετίζεται με μελλοντικές καρδιαγγειακές παθήσεις και με τη χορήγηση ανασταλτικών πεπτιδίων του ACE που προέρχονται από παρασκευάσματα με πρωτεΐνη γάλακτος να μπορεί να βελτιώσει αυτήν την αρνητική επίδραση (Wada and Lönnerdal, 2014).

Στόχος της ερευνητικής κοινότητας είναι η επίτευξη βρεφικών τροφών όμοιες με το μητρικό γάλα κατά το θηλασμό. Έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον η ενίσχυση του αγελαδινού γάλακτος με προσθήκη πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος. Συγκεκριμένα, η προσθήκη α-λακταλβουμίνης ή/και λακτοφερίνης, οι οποίες είναι σε αφθονία στο μητρικό γάλα, είναι μία λύση για τη βελτίωση της ποιότητας των πρωτεϊνών στις βρεφικές τροφές λόγω της ισορροπημένης σύνθεσης αμινοξέων των ευεργετικών ιδιοτήτων, ανάμεσα σε αυτές είναι και οι αντιυπερτασικές (Sandström *et al.*, 2008). Σε

μελέτη των Hernandez-Ledesma *et al.* αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση του ACE σε διάφορες βρεφικές τροφές, όπου οι περισσότερες από αυτές τις τροφές δεν είχαν σημαντική ανασταλτική δράση. Εντοπίστηκαν 2 εξαιρέσεις με αυξημένη ανασταλτική δράση του ACE, όπου και οι 2 ήταν σε πλήρως υδρολυμένη μορφή (η πρώτη formula με ορό γάλακτος και η δεύτερη με καζεΐνες). Επίσης, πραγματοποιήθηκε *in vitro* πέψη σε 2 βρεφικές τροφές με την πρώτη formula να αποτελείται από γάλα που δεν έχει υποστεί υδρόλυση, ενώ η δεύτερη formula να αποτελείται από ορό γάλακτος που ήταν πλήρως υδρολύμενος (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004).

Το τυρόγαλα και ο ΟΟΓ μπορεί να έχουν αντιυπερτασική δράση για τη μελλοντική ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των βρεφικών τροφών. Είναι ένα αξιόλογο εύρημα *in vitro* η ανασταλτική δράση του ACE. Περαιτέρω *in vivo* έρευνα για τη τεκμηρίωση της αντιυπερτασικής δράσης για τα δύο αυτά υποπροϊόντα καθώς και για κάθε μεμονωμένο βιοδραστικό πεπτίδιο που ενδέχεται να προκύψει κρίνεται αναγκαία.

1.7 Αντιοξειδωτική δράση

1.7.1 Εισαγωγή

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού και προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (πχ. O_2^- , OH^\cdot) και μη ριζικά παράγωγα (πχ. H_2O_2 , RS^\cdot) και μπορεί να βλάψει βιομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια (Storz and Imlay, no date). Είναι μια σχετικά νέα έννοια, που χρησιμοποιείται ευρέως στις ιατρικές επιστήμες τις τελευταίες τρεις δεκαετίες (Li *et al.*, 2020). Στον πίνακα 1.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται μία δραστική ένωση που περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και απαιτεί μεγάλη κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman and Slater, 1991). Συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species; ROS), ο οποίος αναφέρεται στις ελεύθερες ρίζες που έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ουσία, η οποία είναι ικανή να παρεμποδίσει ή να αποτρέψει την οξείδωση του υποστρώματος ακόμη και αν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση (Apak *et al.*, 2016).

Πίνακας 1.4 Πηγές ελεύθερων ριζών

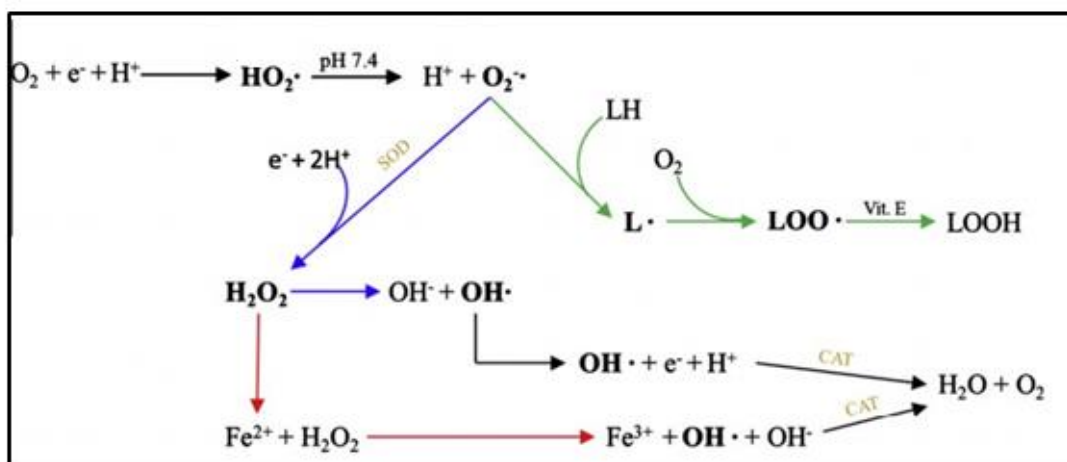
Ελεύθερες ρίζες		
<i>Δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS)</i>	<i>Δραστικές ρίζες αζώτου (RNS)</i>	<i>Δραστικές ρίζες θείου (RSS)</i>
$O_2^{\cdot-}$ (Ανιόν σουπεροξειδίου) O_3 (Οζόν) OH^{\cdot} (Ρίζα υδροξυλίου) H_2O_2 (Υπεροξειδίο υδρογόνου) RO_2^{\cdot} (Ρίζα υπεροξυλίου) $LOOH$ (Λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο)	$ONOO^{\cdot}$ (Νιτρικό υπεροξειδίο) N_2O_3 (Διοξειδίο διαζώτου) HNO_2 (Νιτρώδες οξύ) NO_2Cl (Νιτρυλοχλωρίδιο) NO_2^{\cdot} (Μονοξειδίο του αζώτου)	RS^{\cdot} (Ρίζα θείου)

1.7.2 Μηχανισμός/Λειτουργίες ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) αποδεικνύεται είτε ευεργετική είτε επιβλαβής ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Σε φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού, οι ελεύθερες ρίζες (ROS) λειτουργούν και ως αγγελιοφόροι οξειδοαναγωγής (messengers), εκτός από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην άμυνα του οργανισμού καταστρέφοντας παθογόνους οργανισμούς ή/και στη σύνθεση κυτταρικών δομών (Yang *et al.*, 2013). Οι ROS μπορούν να παραχθούν είτε ενδογενώς (από τα ίδια τα κύτταρα) είτε εξωγενώς και να λάβουν χώρα στην ενδοκυτταρική οδό ή/και στην οδό που εμπλέκονται οξειδοαναγωγικές διαδικασίες να συνεισφέρει στην αλλαγή του κυτταρικού περιεχομένου των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (Checa and Aran, 2020). Μερικές από τις λειτουργίες που ελέγχουν οι ROS είναι η προφλεγμονώδης οδός, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των κυττάρων, η αυτοφαγία, η απόπτωση μιτοχονδρίου (mitoptosis) και μια σειρά από άλλες βιολογικές διεργασίες χωρίς να απαιτείται μακρομοριακή βλάβη (Checa and Aran, 2020). Όλα τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν σε καρδιαγγειακές, πνευμονολογικές ασθένειες, καταρράκτη, καρκίνο καθώς και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer (Zuo *et al.*, 2015). Οι ROS αλληλοεπιδρούν και δύναται

να προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA) οδηγώντας τόσο σε άμεσες όσο και σε έμμεσες επιπτώσεις.

Λιπίδια: Τα λιπίδια των μεμβρανών είναι ευάλωτα σε βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και υποβάλλονται σε μία αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης, επιζήμια για τη λειτουργία του οργανισμού (Wadhwa *et al.*, 2012). Αναλυτικότερα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) είναι ευάλωτα στην επίθεση ριζών ελεύθερων οξυγόνου και αυτό συνεπάγεται την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Μόλις πραγματοποιηθεί η παραγωγή ριζών-ελεύθερες λιπιδίων, ενώνονται με το οξυγόνο που είναι διάχυτο στη μεμβράνη και σχηματίζουν υπεροξειδωμένες ελεύθερες ρίζες. Με αυτόν τον τρόπο, προσβάλλονται οι πρωτεΐνες της μεμβράνης και τα παρακείμενα PUFAs και προάγουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης (Wang *et al.*, 2023). Η διαδικασία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που έχει ως διαμεσολαβητές τα ROS αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, τη μετάδοση και τον τερματισμό. Στο αρχικό στάδιο, ρίζες υδροξυλίου αλληλοεπιδρούν με υδρογόνο για το σχηματισμό ριζών, ελεύθερες λιπιδίων με κεντρικό άτομο τον άνθρακα. Στο στάδιο της διάδοσης, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με το οξυγόνο για τον σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδικών ριζών, οι οποίες αποσπών ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο λιπιδίου και παράγουν νέες ελεύθερες ρίζες και λιπιδικά υδροϋπεροξειδία. Στο τελικό στάδιο, ένα αντιοξειδωτικό (πχ. βιταμίνη E) αποσπά λιπιδικές υπεροξειδικές ρίζες και με ένα άτομο υδρογόνου σχηματίζει μια αντίστοιχη ελεύθερη ρίζα βιταμίνης E και με τη σειρά της αντιδρά με μια ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου για να σχηματίσει ένα προϊόν χωρίς δραστικές ρίζες (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014). Στο διάγραμμα 1.4 απεικονίζεται οι αντιδράσεις σχηματισμού της οξειδωτικής ρίζας. Τέλος αναφέρεται πως η οξειδωση των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες προάγεται και από εξωγενείς φυσικούς και χημικούς παράγοντες (κάπνισμα, υν ακτινοβολία κ.α.), ενδογενείς παράγοντες (NADPH κ.α.) καθώς και κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Pisoschi and Pop, 2015).



Διάγραμμα 1.4 Επισκόπηση των αντιδράσεων που οδηγούν σε σχηματισμό ROS. Τα πράσινα βέλη αντιπροσωπεύουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Προσαρμοσμένο από τους Carocho *et al.* 2013).

Το SOD: δισμουτάση του υπεροξειδίου, CAT: καταλάση, $\text{HO}_2\cdot$: ρίζα υδροϋπεροξυλίου, $\text{O}_2\cdot^-$: ρίζα υπεροξειδίου, $\text{LOO}\cdot$: ρίζα υπεροξυλίου, $\text{OH}\cdot$: ρίζα υδροξυλίου, H_2O_2 : υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα μπλε βέλη αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις Haber-Weiss και τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις Fenton. Τα έντονα γράμματα αντιπροσωπεύουν ρίζες ή μόρια με την ίδια συμπεριφορά (H_2O_2).

Πρωτεΐνες: οι ROS είναι ικανές να οξειδώσουν τόσο τις δομικές πρωτεΐνες όσο και τις πρωτεΐνες του αίματος. Κατά την οξείδωση, οι ROS οδηγούν σε κατακερματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας, μεταβολή του ηλεκτρικού φορτίου των πρωτεϊνών, διασταυρούμενη σύνδεση των πρωτεϊνών και οξείδωση αμινοξέων που ενισχύουν την πρωτεόλυση. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση με αποτέλεσμα να αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες. Επομένως, η αλληλεπίδρασή αμινοξέων με τις ROS προκαλούν αλλαγές στη δομή και το επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Halliwell and Aruoma, 1991; Zuo *et al.*, 2015).

DNA: οι ROS μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το DNA και να οδηγήσουν σε τροποποιήσεις του με διάφορους τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, μεταλλάξεις, ελλείψεις ή μετατοπίσεις και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η πιο εκτενώς μελετημένη βλάβη του DNA είναι ο σχηματισμός του 8-OH-G. Αρκετές μεταβολές συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με τη γήρανση, την καρκινογένεση, τις καρδιαγγειακά, νευροεκφυλιστικά, και αυτοάνοσα νοσήματα (Valko *et al.*, 2007).

1.7.3 Κατηγορίες/ρόλος των αντιοξειδωτικών

Τα βιολογικά συστήματα σε περιβάλλον με O_2 αναπτύσσουν αμυντικούς μηχανισμούς, τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο. Σε φυσιολογικό επίπεδο, υπάρχει ένα μικροαγγειακό σύστημα για τη διατήρηση της λειτουργίας των επιπέδων του O_2 στους ιστούς, ενώ σε βιοχημικό επίπεδο υπάρχει ένα σύστημα επιδιόρθωσης μορίων και η αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να είναι είτε ενζυμική είτε μη ενζυμική. Οι κατηγορίες των αντιοξειδωτικών παρουσιάζονται συνοπτικά στο διάγραμμα 1.5. Επίσης, τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε ενδογενή, δηλαδή τα αντιοξειδωτικά που συντίθενται στον οργανισμό (ενζυμικής και μη ενζυμικής προέλευσης) και σε εξωγενή, τα οποία και διαχωρίζονται σε φυσικά και συνθετικά.

Ενζυμικό σύστημα

Τα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) και η οξυγενάση της αίμης

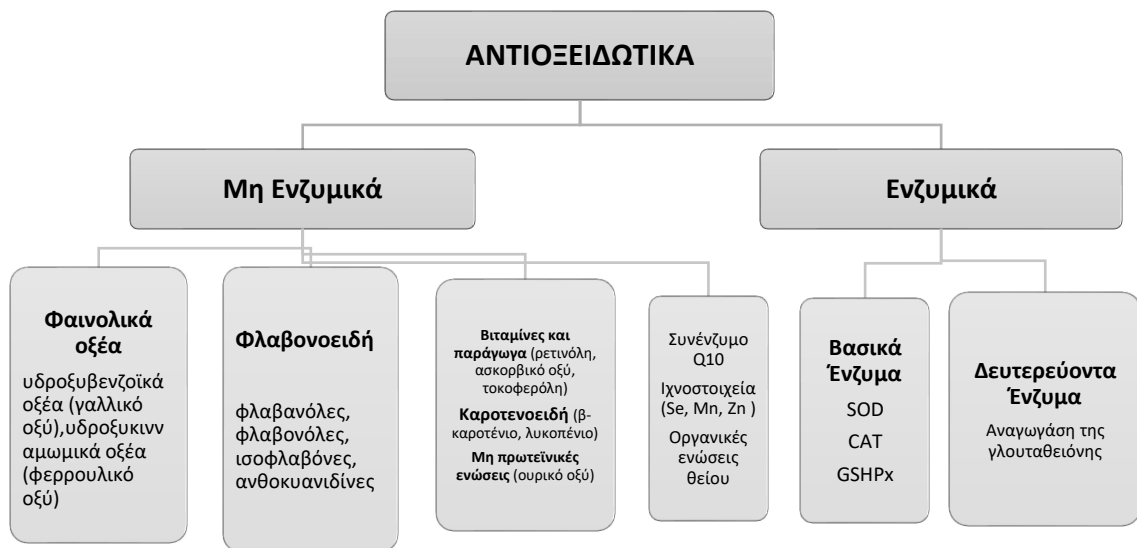
Στον ανθρώπινο οργανισμό το SOD είναι βασικός μηχανισμός άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες και καταλύει αντιδράσεις μετατροπής της δραστηκής ρίζας του οξυγόνου είτε προς μοριακό οξυγόνο είτε προς υπεροξείδιο του υδρογόνου. Χωρίζεται σε 3 ισομορφές: το ενδοκυτταρικό Cu/Zn-SOD (SOD1), το μιτοχονδριακό Mn-SOD (SOD2) και το εξωκυτταρικό Cu/Zn-SOD (SOD3/Ec-SOD), και απαιτούν παρουσία μετάλλων για τη δραστηριοποίησή τους (Fridovich, 1995; Faraci and Didion, 2004).

Η CAT είναι ένα ακόμη ένζυμο δισμουτάσης, αποτελείται από ένα τμήμα αίμης στη δραστηκή θέση, έχει ως συμπαραγόντα Fe ή Mn και καταλύει την αντίδραση δύο μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό (Chelikani, Fita and Loewen, 2004; Kodydková *et al.*, 2014). Η βασική του λειτουργία είναι η απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O_2 κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων.

Η GSHPx είναι εξαρτώμενο από το σελήνιο ένζυμο, καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων σε νερό και αλκοόλες αντίστοιχα (Battin and Brumaghim, 2009). Εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα και στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν τουλάχιστον 8 διαφορετικά ένζυμα GSPx, GSPx1-GSPx8, με την GSPx1 να βρίσκεται σε αφθονία σε όλα τα σχεδόν τα κύτταρα και να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της διαδικασίας της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

✚ Μη ενζυμικό σύστημα

Σε αυτό το σύστημα, τα αντιοξειδωτικά δρουν διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Αναλυτικότερα, περικλείουν τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνουν προσφέροντας ηλεκτρόνια. Με αυτόν τον τρόπο και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, τα αντιοξειδωτικά γίνονται ελεύθερες ρίζες αλλά λιγότερο δραστικές από την αρχική μορφή τους. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες των αντιοξειδωτικών εξουδετερώνονται εύκολα από άλλα αντιοξειδωτικά. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν αντιοξειδωτικές ενώσεις ή ενώσεις που είναι ικανές να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες όπως είναι η βιταμίνη C, βιταμίνη E, καροτενοειδή, φερριτίνη, σελήνιο, γλουταθειόνη (GSH), μαγγάνιο, ψευδάργυρος, φλαβονοειδή, συνένζυμο Q (CoQ), ταυρίνη και κυστεΐνη (Haida and Hakiman, 2019; Khan *et al.*, 2019; Munteanu and Apretrei, 2021).



Διάγραμμα 1.5 Κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών

1.7.4 Δράση αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή ανάλογα με τις λειτουργίες τους. Τα πρωτογενή είναι αντιοξειδωτικά που διασπούν την αλυσίδα και είναι ικανά να εξουδετερώσουν δραστικές ρίζες κατά την έναρξη ή κατά τη διάδοση της οξείδωσης. Τα δευτερογενή ή συνεργιστικά αντιοξειδωτικά, δεν είναι ικανά για τη μετατροπή των ελεύθερων ριζών σε πιο σταθερά προϊόντα. Διακρίνονται σε δεσμευτές οξυγόνου και χηλικά προ-οξειδωμένα μέταλλα και συγκριτικά με τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά διαθέτουν πιο πολύπλοκους μηχανισμούς (Gad and Sayd, 2015).

1.7.5 Αντιοξειδωτική δράση γαλακτοκομικών προϊόντων

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στα φυσικά αντιοξειδωτικά (natural antioxidants) και αυτό οφείλεται στην ανησυχία που επικρατεί για τη συνεχή χρήση εμπορικά διαθέσιμων συνθετικών αντιοξειδωτικών (Siddeeg *et al.*, 2021). Εκτός από τα λαχανικά, τα φρούτα, τα βότανα, τα μπαχαρικά και τους ξηρούς καρπούς (Bolling *et al.*, 2012; Nongonierma *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019; Cho, 2020), μία μεγάλη κατηγορία είναι και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Conway, Gauthier and Pouliot, 2013; Aspri *et al.*, 2018).

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αντιπροσωπεύουν περίπου το 25-30% της ανθρώπινης διατροφής του μέσου καταναλωτή και είναι αναμφίβολα μία πλούσια πηγή ενώσεων που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Guha *et al.*, 2021). Περιέχουν λιπόφιλα (CLA, τοκοφερόλη, coQ10) και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά μόρια όπως βιταμίνη C και ιχνοστοιχεία (Grażyna *et al.*, 2017). Έρευνες έχουν δείξει πως η αντιοξειδωτική δράση των γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται, κυρίως, σε πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος, όπως η β-γαλακτογλοβουλίνη (β-Lg) και η λακτοφερίνη (Lf), σε θειούχα αμινοξέα, (π.χ. κυστεΐνη), στις βιταμίνες A, E και C, στα καροτενοειδή και στα ενζυμικά συστήματα SOD, CAT, GSP_x. (Power, Jakeman and Fitzgerald, 2013). Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση στα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση οφείλεται κυρίως στα βιοενεργά πεπτίδια που απελευθερώνονται από την α-La, β-Lg και καζεΐνες (Park and Nam, 2015).

Η αντιοξειδωτική δράση των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι εξαρτώμενη από διάφορους παράγοντες όπως η προέλευση του γάλακτος, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, η διατροφή, η σύστασή του γάλακτος, η περιεκτικότητα σε λίπος και η διαδικασία παραγωγής (Pihlanto, 2006; Cloetens, Panee and Åkesson, 2013; Stobiecka, Król and Brodziak, 2022). Η διαδικασία ζύμωσης και ωρίμανσης των τυριών σχετίζεται με την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων, τα οποία και ευθύνονται για το αντιοξειδωτικό επίπεδο του τυριού (Stobiecka, Król and Brodziak, 2022). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πρωτεϊνών συνδέονται άμεσα με τη σύστασή τους σε αμινοξέα (Khan *et al.*, 2019). Με τη σειρά τους τα αμινοξέα δρουν ως αντιοξειδωτικά, κυρίως περιορίζοντας τη δράση των σουλφυδρυλικών ομάδων τους (κυστεΐνη και μεθειονίνη) ή προσφέροντας κατάλοιπα αρωματικών ενώσεων (τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη) (Barac *et al.*, 2019a). Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών έχει άμεση σχέση με τη σωστή θέση των αμινοξέων μέσα στις πρωτεϊνικές

αλληλουχίες (Stobiecka, Król and Brodziak, 2022). Οι Zulueta και οι συνεργάτες του επισημαίνουν πως η αντιοξειδωτική δράση που έχει το γάλα οφείλεται πρωτίστως στις καζεΐνες (Zulueta *et al.*, 2009).

1.7.6 Αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών ορού του γάλακτος

Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος αποτελούν κατά προσέγγιση το 20% των πρωτεϊνών του γάλακτος, με τα υπό μελέτη γαλακτοκομικά υποπροϊόντα (τυρόγαλα και ΟΟΓ) να τα απαρτίζουν σχεδόν αποκλειστικά οι πρωτεΐνες του ορού. Η β-Lg αντιπροσωπεύει περίπου το 50-55% των πρωτεϊνών του ορού και έχει υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό από άλλα προϊόντα διατροφής. Αυτό σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα σε θειούχα αμινοξέα, ιδιαίτερα της κυστεΐνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση γλουταθειόνης (Ma, Wang and Guo, 2018). Ακόμη έχει αναφερθεί πως τα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες του ορού γάλακτος έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Chen, Lindmark-Månsson and Åkesson, 2000). Σε προηγούμενη μελέτη αναφέρθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική δράση της λακτοφερίνης που είχε υποστεί υδρόλυση για 4 ώρες στους 50 °C με εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα (Nongonierma and Fitzgerald, 2013). Επιπρόσθετα, οι Hernandez-Ledesma και συνεργάτες αναγνώρισαν 42 πεπτιδικά θραύσματα σε προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών ορού γάλακτος (α-La και β-Lg) με χρήση διαφορετικών ενζύμων (πεψίνη, θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, θερμολυσίνη και Corolase PP), με την αλληλουχία WYSLAMAASDI να παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Hernández-Ledesma, Dávalos, *et al.*, 2005). Παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για την WPI που είχε υποστεί υδρόλυση με διάφορες πρωτεάσες, με τη μεγαλύτερη αύξηση να εντοπίζεται στο υδρόλυμα που παράχθηκε με αλκαλάση (Zhang *et al.*, 2013). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ αντιοξειδωτικής ικανότητας υδρολυμάτων του συμπυκνώματος ορού γάλακτος (whey protein concentrate; WPC) και του αποβουτυρωμένου γάλακτος δεν παρατηρήθηκε με την ανάλυση ORAC. Αυτό υποδηλώνει ότι τα πεπτίδια που προέρχονται από τις κύριες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (α-La και β-Lg) είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση, εφόσον η περιεκτικότητα σε καζεΐνες του αποβουτυρωμένου γάλακτος είναι περίπου 80% και δε βελτίωσε την αντιοξειδωτική δράση σε σημαντικό βαθμό (Conway, Gauthier and Rouliot, 2013). Τέλος, έχουν γίνει αναφορές πως τόσο οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος όσο και τα υδρολύματά τους μπορούν να έχουν αντιοξειδωτική χρησιμότητα ως λειτουργικά συστατικά σε προϊόντα κρέατος (Peña-Ramos and Xiong, 2003).

1.7.7 Μέθοδοι εκτίμησης και προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Οι σημαντικότερες μέθοδοι αντιοξειδωτικής δράσης χωρίζονται με βάση το μηχανισμό δράσης στον οποίο στηρίζονται. Η αντίδραση είναι ικανή να πραγματοποιηθεί είτε με τη μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer; HAT) είτε με τη μεταφορά ενός μονήρους ηλεκτρονίου (single electron transfer; SET) είτε με συνδυασμό αυτών των μηχανισμών (Huang, Boxin and Prior, 2005).

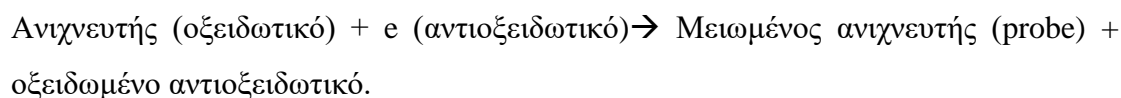
1.7.7.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με HAT

Μέτρηση της ικανότητας μίας αντιοξειδωτικής ουσίας να ανιχνεύει μία ελεύθερη ρίζα με προσφορά ενός υδρογόνου. Οι αντιδράσεις HAT είναι άμεσες, γρήγορες και στηρίζονται στην κινητική της αντίδρασης (ανταγωνιστική μεταξύ αντιοξειδωτικής ουσίας και οξειδωτικού μέσου) και η ποσοτικοποίηση απορρέει από την κινητική της καμπύλης. Το οξειδωτικό μέσο είναι κυρίως συνθετικό και σε γενικές γραμμές, η ανάλυση HAT είναι εξαρτώμενη από την ενθαλπία δεσμού (bond dissociation enthalpy) του συμπλέγματος δότη υδρογόνου του αντιοξειδωτικού. Η αντίδραση που περιγράφει το μηχανισμό αυτόν είναι:



1.7.7.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με SET

Μέτρηση της ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού να μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο. Βασίζονται σε μία αντίδραση οξειδοαναγωγής, με το οξειδωτικό να είναι ο ανιχνευτής της αντίδρασης και ο δείκτης του τελικού σημείου της αντίδρασης. Μετράει και την αναγωγή ενώσεων όπως μέταλλα, καρβονύλια κ.α. Η αντίδραση που περιγράφει το μηχανισμό αυτόν είναι:



Οι πιο κοινές *in vitro* μέθοδοι αντιοξειδωτικής δράσης παρουσιάζονται στον πίνακα 1.5. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή και παρουσιάζονται στο κεφάλαιο της Μεθοδολογίας της Πειραματικής Διαδικασίας είναι οι ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS και σε κυτταρικό επίπεδο η αντιοξειδωτική ικανότητα (CAA; cellular antioxidant activity) παρουσία H₂O₂.

Πίνακας 1.5 Οι πιο κοινές αναλύσεις αντιοξειδωτικής δράσης, οι μηχανισμοί δράσης και τα τελικά προϊόντα

Ονομασία μεθόδου αντιοξειδωτικής δράσης	Μέθοδος αντιοξειδωτικής δράσης	Μηχανισμός δράσης¹	Μέθοδος και τελικό προϊόν
Ferric reducing power	FRAP	SET	Φασματοφωτομετρία (άχρωμο σε κυανό; 590 nm)
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH radical scavenging activity	SET ή HAT	Φασματοφωτομετρία (μωβ σε απαλό κίτρινο; 517 nm)
potassium ferricyanide reducing power	P-FRAP	SET	Φασματοφωτομετρία (κίτρινο σε βαθύ μπλε; 700 nm)
Cupric reducing antioxidant capacity	CUPRAC	SET	Φασματοφωτομετρία (γαλάζιο σε πορτοκαλί; 450 nm)
Total phenols by Folin-Ciocalteu	FC	SET	Φασματοφωτομετρία (κίτρινο σε μπλε; 765 nm)
High-performance liquid chromatography	HPLC	Ανακατανομή μεταξύ στερεάς ακίνητης φάσης και υγρής κινητής φάσης με διαφορετική πολικότητα	Ανίχνευση UV–VIS, φθορισμός, Φασματοφωτομετρία μάζας, ηλεκτροχημική ανίχνευση
ABTS scavenging activity	ABTS	SET ή HAT	Φασματοφωτομετρία (απαλό κίτρινο σε τιρκουάζ; 734 nm)

Oxygen radical absorbance	ORAC	HAT	Φασματοφωτομετρία (485 nm/535 nm)-απώλεια φθορισμού της φλουορεσκεΐνης
Scavenging of nitric oxide	Griess	HAT	Φασματοφωτομετρία (άχρωμο σε ροζ; 540 nm)

¹ HAT: ενός ατόμου υδρογόνου, SET: μεταφορά ενός μονήρους ηλεκτρονίου

1.7.8 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας σε επίπεδο κυττάρου

Στις αρχές της δεκαετίας του 2010 αναγνωρίστηκε από την επιστημονική κοινότητα πως οι τεχνολογίες HAT και SET δεν έχουν άμεση συσχέτιση με την αναμενομένη επίδραση στον οργανισμό. Ένα αντιοξειδωτικό μόριο δεν αρκεί να έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες αλλά πρέπει να επίσης να παρουσιάζεται και ως αποτέλεσμα. Οι αναλύσεις που αναπτύχθηκαν πρόσφατα παρέχουν πολύ σημαντικές πληροφορίες στον τρόπο δράσης των αντιοξειδωτικών σε υποκυτταρικό επίπεδο (Furger, 2021).

Η συντριπτική πλειοψηφία των κυτταρικών συστημάτων που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι απαθανατισμένες κυτταρικές σειρές όπως η Caco-2, HT-29, THP-1, HepG2 κ.α. Παρουσιάζουν καρκινικό φαινότυπο, με ικανότητα πολλαπλασιασμού για πολλές γενεές και συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ μελετών αφού πλέον έχουν καθιερωθεί ως τα πιο κατάλληλα κυτταρικά συστήματα (Allen *et al.*, 2005).

Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες αντιοξειδωτικής επίδρασης που μπορούν να προσδιοριστούν σε κυτταρικό επίπεδο, η άμεση και η έμμεση. Η κατηγορία της «άμεσης επίδρασης» σχετίζεται με την ικανότητα του δείγματος να εξουδετερώνει την παρουσία ενδοκυτταρικών ελεύθερων ριζών ή ROS (ειδικά H₂O₂) που παράγονται από τα κύτταρα. Η έννοια της κυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (cellular antioxidant activity; CAA) αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1990 (Rosenkranz *et al.*, 1992) που οδήγησε σε μία προσέγγιση που επέτρεπε τη μέτρηση των ενδοκυτταρικών ROS μέσω του ανιχνευτή DCFH-DA. Η DCFH-DA είναι μία πολική και μη ιοντική μορφή της DCFH που εύκολα μπορεί να μεταφερθεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Τότε, ο εστερικός δεσμός υδρολύεται από ενδογενείς κυτταρικές εστεράσες, επαναφέροντας τον ανιχνευτή σε πιο οξειδωμένη μορφή, περιορίζοντας το νεοσχηματιζόμενο πολικό μόριο DCFH να μετακινηθεί προς το εξοκυττάριο μέσο. Εξίσου, το πρωτόκολλο CAA χρειάζεται απαραίτητα την προσθήκη ουσίας που να θεωρείται παραγωγός ROS όπως

είναι το AAPH, αλλιώς ABAP (Wang and Joseph, 1999). Εναλλακτικά, πραγματοποιείται και προσθήκη H_2O_2 ή μεναδιόνης ως παράγοντα επαγωγής οξειδωτικού στρες (Shoji *et al.*, 2007; Ballatore *et al.*, 2020).

Η δεύτερη κατηγορία, η κατηγορία της «έμμεσης επίδρασης», σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται κυρίως τα μονοπάτια ARE/Nrf2 και ρυθμίζει τη μεταγραφή οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών (Furger, 2021). Το Nrf2 είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας για την κυτταρική ομοιόσταση και ασκεί, εκτός από αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδη και αντι-αποπτωτική δράση αλληλοεπιδρώντας με πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης (Tang *et al.*, 2017). Επομένως, η επικοινωνία (cross-talk) μεταξύ NF-κB και Nrf2 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταρικής κατάστασης και την επίλυση της φλεγμονής (Zhao *et al.*, 2019). Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα διαδραματίζουν απαραίτητο ρόλο στη φλεγμονή και με την προσθήκη LPS, τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συνθέτουν ενδοκυτταρικές προστατευτικές πρωτεΐνες όπου εμπλέκονται και στην κυτταρική αυτοπροστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (Rushworth *et al.*, 2005).

Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες ενδέχεται να είναι αυξημένο στις κυτταρικές καλλιέργειες, μια κατάσταση που μπορεί οδηγεί σε υποεκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων που αναλύονται. Πιθανοί λόγοι είναι η αύξηση των ROS σε συνθήκες καλλιέργειας με τάση το θρεπτικό μέσο να συμπεριφέρεται ως προοξειδωτικό, η αυξημένη συγκέντρωση O_2 , η έλλειψη σεληνίου και η απουσία θρεπτικού μέσου στον ζωντανό οργανισμό όσον αφορά τα φυσικά αντιοξειδωτικά συστήματα (Furger, 2021).

Τα τελευταία χρόνια, η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε επίπεδου κυττάρου είναι πολύ διαδεδομένη. Αρκετές πρωτεΐνες και πεπτίδια και υδρολύματα αυτών από διάφορες τροφές, εκτός των γαλακτοκομικών που θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο, έχουν αξιολογηθεί υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές. Οι Yi *et al.* μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση του πεπτιδίου IRW, προερχόμενο από πρωτεΐνη του αυγού σε Caco-2 διεγερμένα με H_2O_2 , επιδεικνύοντας προστατευτική δράση μειώνοντας τα επίπεδα ROS (Yi, Zhao and Wu, 2017). Παρόμοια αποτελέσματα για το QIGLF, προερχόμενο από την ωοαλβουμίνη, προστέθηκε στα κύτταρα Caco-2 που ακολουθήθηκε από προσθήκη H_2O_2 και έδειξε σημαντική κυτταροπροστατευτική επίδραση έναντι του οξειδωτικού στρες που

προκαλείται από το H₂O₂ (Ding *et al.*, 2014). Σε πρόσφατες μελέτες έχει διερευνηθεί επίσης το αντιοξειδωτικό δυναμικό σε κυτταρικό επίπεδο για διάφορα φυτά. Μία από αυτές είναι των Ferreira *et al.* που έδειξαν πως η έκθεση των κυττάρων HepG2 και Caco-2 σε εκχυλίσματα σαμπούκου (50 µg/mL) απέτρεψε μέχρι και 90 % την τοξικότητα που προκαλείται από το *τριτ*-βουτυλ υδροϋπεροξειδίο (*tert*-butyl hydroperoxide; t-BOOH). (Ferreira *et al.*, 2022). Επίσης, η μελέτη των Wang *et al.* διερεύνησε τις επιδράσεις ενός φαινολικού εκχυλίσματος σταφυλιού, όπου προκύπτει από τις βιομηχανίες σταφυλιών/οίνου ως υποπροϊόν, και τις φαινολικές ενώσεις του, όπως είναι το γαλλικό οξύ και συριγγικό οξύ σε κύτταρα Caco-2, άμεσα ή μετά από κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από το t-BOOH) και κατέληξαν πως 10 mg/mL του φαινολικού εκχυλίσματος σταφυλιού, 10 mM γαλλικού οξέος και 1 mM συριγγικού οξέος είναι ικανά να μειώσουν σημαντικά την παραγωγή ROS σε Caco-2 κύτταρα (Wang *et al.*, 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάδειξη των βιολειτουργικών ιδιοτήτων του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ με έμφαση στις: α) ανοσορυθμιστικές β) αντιυπερτασικές και γ) αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αξιολογήθηκε η επίδραση: 1^{ον}) της ζωικής προέλευσης, 2^{ον}) της εποχικότητας (το στάδιο της γαλακτικής περιόδου) και 3^{ον}) της γεωγραφικής προέλευσης στις παραπάνω βιολειτουργικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων.

Πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων τυρογάλακτος και ΟΟΓ από διάφορες περιφέρειες της Ελληνικής ηπειρωτικής επικράτειας, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και διαφορετικής ζωικής προέλευσης και αφού δοκιμάστηκε η δραστηριότητά τους, τα δείγματα υπέστησαν κατάλληλη *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης με ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στατικό μοντέλο. Προέκυψαν διαπερατά κλάσματα πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και αξιολογήθηκαν και αυτά ως προς τις βιολειτουργικές τους ιδιότητες.

Τα πρωτεϊνικά κλάσμα αποτελούμενο από πεπτίδια μικρότερο από 3 kDa μελετήθηκε ως προς τις ανοσορυθμιστικές τους ιδιότητες σε δύο κυτταρικές σειρές, την THP-1 και RAW 264.7. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η επίδραση της επώασης των κυττάρων παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων τυρογάλακτος και ΟΟΓ στην έκφραση μίας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης πριν και μετά από πρόκληση με τη χρήση LPS.

Επιπλέον, αξιολογήθηκαν οι αντιυπερτασικές ιδιότητες των δειγμάτων μέσω της ACE ανασταλτικής δράσης τους πριν και μετά από την *in vitro* πέψη με τη χρήση φασματοφωτομετρίας.

Τέλος, εκτιμήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων πριν και μετά από την *in vitro* πέψη με τέσσερις βιοχημικές μεθόδους και σε επίπεδο κυττάρου με τη χρήση της κυτταρικής σειράς HT-29.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

3.1. Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συλλογή δειγμάτων (τυρόγαλα και ΟΟΓ) από αγελαδινό, πρόβειο, αίγιο και αιγοπρόβειο γάλα (μόνο για τυρόγαλα), από τυροκομεία μικρής και μεσαίας δυναμικότητας καθώς επίσης και από βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας, για να μελετηθεί η επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης. Επίσης, χωρίστηκαν σε 2 ομάδες (καλοκαιρινά και χειμερινά) για την αξιολόγηση της επίδρασης της εποχικότητας στις βιολογικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών αυτών υποπροϊόντων. Συνολικά, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν 48 και 33 δείγματα τυρογάλακτος και ΟΟΓ αντιστοίχως.

Εν συνεχεία, με την υποστήριξη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής της Ζωικής Παραγωγής του ΓΠΑ, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του ολικού αζώτου όλων των δειγμάτων με τη μέθοδο Kjeldahl με διπλή μέτρηση για κάθε δείγμα (καύση, απόσταξη και τιτλοδότηση). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη % των δειγμάτων προσδιορίστηκε πολλαπλασιάζοντας το ολικό άζωτο με το συντελεστή 6,38 (Morais *et al.*, 2015; (IDF), 2016; Altuntas and Haroglu, 2019; Elgar *et al.*, 2020).

Ακολούθησε λυοφιλίωση όλων των δειγμάτων στον ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ και η ανάλογη επανασύσταση αυτών με δις απεσταγμένο νερό με σκοπό να έχουν 3% και 0,9% πρωτεΐνοπεριεκτικότητα για τα δείγματα τυρογάλακτος και ΟΟΓ αντιστοίχως. Σημειώνεται πως η σύσταση της πρωτεΐνης των δειγμάτων, μετά τη λυοφιλίωση και ανασύσταση, προσδιορίστηκε με τη συσκευή Milkoscan Foss FT120 (Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, ΓΠΑ) πραγματοποιώντας διπλή μέτρηση σε κάθε δείγμα.

Συνοπτικά στον πίνακα 3.1, παρουσιάζονται τα στοιχεία όλων των δειγμάτων που αφορούν τη ζωική και γεωγραφική προέλευση, την εποχικότητα και το εύρος της πρωτεΐνοπεριεκτικότητας και του pH.

Πίνακας 3.1 Διαχωρισμός δειγμάτων ανά ζωική, γεωγραφική προέλευση και εποχικότητα για τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα καθώς και η μέση τιμή πρωτεΐνης και pH

ΤΥΡΟΓΑΛΛΑ			ΟΟΓ		
ΖΩΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	Συνολικός	48	ΖΩΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	Συνολικός	33
	Αριθμός δειγμάτων			Αριθμός δειγμάτων	
	Αίγιο	12		Αίγιο	8
	Πρόβειο	12		Πρόβειο	7
	Αγελαδινό	12		Αγελαδινό	18
	Αιγοπρόβειο	12		Αιγοπρόβειο	0
ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία	14	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία	10
	Μακεδονία και Θράκη	18		Μακεδονία και Θράκη	8
	Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα	16		Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα	15
ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑ	Καλοκαίρι ¹	24	ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑ	Καλοκαίρι	13
	Χειμώνας ²	24		Χειμώνας	20
Πρωτεΐνη % πριν τη λυοφιλίωση	0,3%-2,1%		Πρωτεΐνη % πριν τη λυοφιλίωση	0,09-1,2%	
Πρωτεΐνη % μετά τη λυοφιλίωση	3%		Πρωτεΐνη % μετά τη λυοφιλίωση	0,9%	
pH	4,8-6,7		pH	3,7-4,7	

¹Καλοκαίρι: Μάιος-Οκτώβριος, ²Χειμώνας: Νοέμβριος-Απρίλιος

3.2 *In vitro* προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης

Τα τελευταία χρόνια αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση μοντέλων, μέσω των οποίων θα προσομοιώνεται η πορεία της ανθρώπινης πέψης. Το μοντέλο μπορεί να είναι είτε *in vivo* που πραγματοποιείται σε ζώα και ανθρώπους είτε *in vitro*, που πραγματοποιείται σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Τα *in vitro* μοντέλα χωρίζονται στα στατικά και τα δυναμικά. Για να επιτευχθεί ο σκοπός της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης όπως παρουσιάζεται στο βελτιωμένο πρωτόκολλο INFOGEST 2.0. (Minekus *et al.*, 2014; Brodtkorb *et al.*, 2019), σε συνθήκες όμοιες με αυτές που επικρατούν στη φυσιολογική πέψη ενός τροφίμου εντός του ανθρώπινου οργανισμού.

Το πρωτόκολλο βασίζεται σε μια διεθνή συνεργασία που αναπτύχθηκε από το δίκτυο COST INFOGEST, με στόχο να εξαλείψει τις διαφορές στη μεθοδολογία που παρουσιάζονται σε *in vitro* συστήματα προσομοίωσης πέψης και να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα στην επίδραση βιολειτουργικών τροφίμων.

Πειραματικός σχεδιασμός:

Αρχικά γίνεται ο προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων (πεψίνη, παγκρεατίνη) καθώς και της συγκέντρωσης των χολικών οξέων. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται διαλύματα αλάτων και τέλος ακολουθεί η διαδικασία της *in vitro* πέψης δειγμάτων.

➤ Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων και συγκέντρωσης χολικών

Τα ένζυμα πεψίνη και παγκρεατίνη αποτελούν τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στη γαστρεντερική πέψη των γαλακτοκομικών προϊόντων (Aabøe *et al.*, 2010; Bamdad *et al.*, 2017; Markell *et al.*, 2017; de Morais *et al.*, 2020). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ο ενζυμικός προσδιορισμός της πεψίνης και της παγκρεατίνης (μέσω προσδιορισμού τρυψίνης) που βασίζεται στην ταξινόμηση του αριθμού επιτροπής ενζύμων και είναι τα E.C. 3.4.23.1 και E.C. 3.4.21.4 αντιστοίχως. Οι ενεργότητες των ενζύμων και η συγκέντρωση των χολικών αλάτων που υπολογίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Ενεργότητες ενζύμων και συγκέντρωση χολικών αλάτων

<i>Ένζυμα και χολικά άλατα</i>	<i>Ενεργότητα/Συγκέντρωση</i>
<i>Πεψίνη</i>	2139 Units/mg
<i>Παγκρεατίνη</i>	9 Units/mg
<i>Χολικά άλατα*</i>	139,2 mM

*Η συγκέντρωση των χολικών αλάτων υπολογίστηκε με τη χρήση του kit MAK309, Sigma (0,696 mmol/gr) για την επίτευξη 5 mM στο τελικό διάλυμα (Bile extract porcine, Sigma-Aldrich, B8631).

➤ **Παρασκευή διαλυμάτων αλάτων και διαλυμάτων SSF, SGF και SIF**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων αλάτων ζυγίστηκαν κατάλληλες ποσότητες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.3), και διαλύθηκαν σε δις απεσταγμένο νερό Milli Q. Έπειτα, παρασκευάστηκε μια σειρά από διαλύματα αλάτων, που αποτέλεσαν τη βάση για τα διαλύματα προσομοίωσης σιελογόνου υγρού (Simulated Salivary Fluid, SSF), γαστρικού υγρού (Simulated Gastric Fluid, SGF) και εντερικού υγρού (Simulated Intestinal Fluid, SIF).

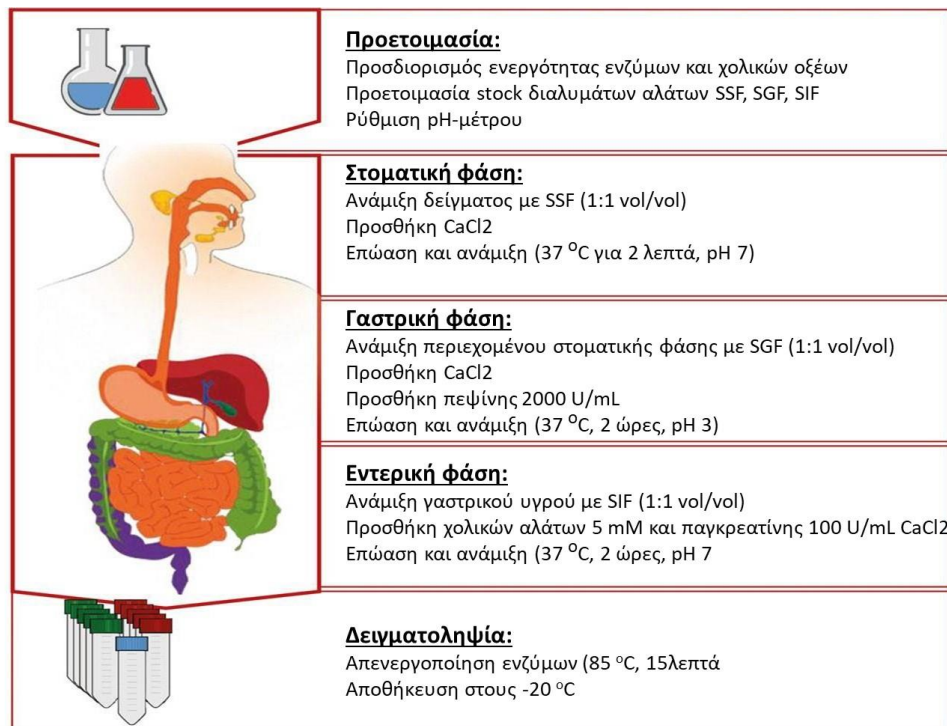
Πίνακας 3.3 Ποσότητες αλάτων για την παρασκευή διαλυμάτων SSF, SGF και SIF (Προσαρμοσμένο από τους Brodtkorb et al., 2019)

		SSF (PH 7)		SGF (PH 3)		SIF (PH 7)	
Διαλύματα αλάτων	Συγκεντρώσεις αλάτων	Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SSF	Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SGF	Απαιτούμενος όγκος για την παρασκευή 0,4 L (1,25x)	Τελική συγκέντρωση αλάτος στο SIF
		(ml)	(mM)	(ml)	(mM)	(ml)	(mM)
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	0,9	0,9	0,8	0,1
NaHCO ₃	84	1	6,8	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	-	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,4	0,12	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,5	0,5	-	-
HCl	44,1	6	0,09	1,3	15,6	0,7	8,4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂		0,3	0,025	0,005	0,15	0,04	0,6

➤ Αναλυτική πορεία *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης

Αρχικά, τοποθετήθηκαν τα SSF, SGF, SIF και τα χολικά άλατα στους 37 °C και τα ένζυμα σε πάγο. Μαζί με τα δείγματα προετοιμάστηκαν και τυφλά χωρίς τρόφιμο (blank) αντικαθιστώντας τα με Milli Q H₂O και ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία της πέψης. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία της *in vitro* προσομοίωσης γαστρεντερικής πέψης. Να αναφερθεί πως δεν πραγματοποιείται προσθήκη αμυλάσης και γαστρικής λιπάσης λόγω απουσίας αμύλου και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια αντίστοιχα στα δείγματα τυρογάλακτος και ΟΟΓ (Brodkorb *et al.* 2019).

Εικόνα 3.1 Αναπαράσταση χρόνου και ροής της μεθόδου *in vitro* πέψης τροφίμου INFOGEST 2.0



🚦 Oral phase (Στοματική φάση)

Για το στάδιο της στοματικής φάσης μεταφέρθηκαν αρχικά οι απαιτούμενες ποσότητες δειγμάτων με σκοπό όλα τα δείγματα να έχουν την ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης (30 mg/mL για τυρόγαλα και 9 mg/mL για ΟΟΓ) και τελικό όγκο τροφίμου 5 mL. Έπειτα προστέθηκαν 4 mL SSF και 25 μL CaCl₂ και ρυθμίστηκε το pH στο 7 με NaOH. Ακολούθησε η συμπλήρωση των δειγμάτων με νερό με τελικό όγκο στη στοματική φάση τα 10 mL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση με κίνηση στους 37 °C για 2 λεπτά.

Gastric phase (Γαστρική φάση)

Με την παρέλευση των 2 λεπτών προστέθηκαν 8 mL SGF, 1 mL πεψίνης (2.000 U/mL) και 5 mL CaCl₂. Το pH ρυθμίστηκε στο 3 με HCl και στη συνέχεια συμπληρώθηκε Milli Q H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 20 mL. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κινούμενο τροχό μέσα σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C για 2 ώρες.

Intestinal phase (Εντερική φάση)

Μετά την πάροδο των 2 ωρών, στο «γαστρικό χυμό» πραγματοποιήθηκε προσθήκη 8 mL SIF, 5 mL παγκρεατίνης (100 U/mL), 40 μL CaCl₂, 2,87 mL χολικών (5 mM) και ακολούθησε ρύθμιση του pH στο 7 με NaOH και συμπλήρωση με Milli Q H₂O μέχρι τελικό όγκο 40 mL. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 37° C για 2 ώρες.

Με την ολοκλήρωση της εντερικής φάσης, ακολούθησε θερμικό σοκ στους 85 °C για 10 λεπτά με σκοπό την αδρανοποίηση της πρωτεασών και τη μετέπειτα αξιολόγηση βιολογικής δραστηριότητας των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα στους -20 °C.

3.3 Κλασμάτωση δειγμάτων μετά την πέψη

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά/1200 g/25° C για την κατακρήμνιση μη πεφθέντων/χωνεμένων πρωτεϊνών και φιλτράρισμα 0,22 μm για την απομάκρυνση μικροοργανισμών και άλλων υλικών. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πεπτιδίων με τη βοήθεια των φίλτρων τύπου Amicon (Milipore). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 10 kDa και 3 kDa (MWCO 10 kDa και 3 kDa αντιστοίχως). Τα δείγματα μετά την πέψη, διαχωρίστηκαν αρχικά με cut-off φίλτρα των 10 kDa σε διαπερατό (permeate 10 kDa) και κατακρηθέν (retentate 10 kDa) κλάσμα. Μέρος του διαπερατού κλάσματος που προέκυψε (permeate 10 kDa), διήλθε από μεμβράνη υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 3 kDa. Τα κλάσματα που προέκυψαν είναι το διαπερατό της 3 kDa μεμβράνης (permeate 3 kDa), αποτελούμενο από πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους (χαμηλότερο των 3 kDa) και το κατακρηθέν με πεπτίδια μοριακού βάρους 3-10 kDa (retentate 10 kDa). Στον πίνακα 3.4 ορίζονται και παρουσιάζονται συνοπτικά τα δείγματα του τυρογάλακτος, του ΟΟΓ και των τυφλών. Τα τελικά προϊόντα της γαστρεντερικής πέψης όλων των δειγμάτων καθώς και τα κλάσματα αυτών αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

Πίνακας 3.4 Ορισμός δειγμάτων που προκύπτουν κατά την προσομοίωση της *in vitro* γαστρεντερικής πέψης

Πριν την πέψη-μετά τη λυοφιλίωση και επανασύσταση ως προς πρωτεϊνοπεριεκτικότητα	<i>Τυρόγαλα (sweet whey; SW)</i>	SW	<i>Όξινος ορός γιαούρτης (acid whey; AW)</i>	AW	<i>Χωρίς τρόφιμο-Τυφλό (blank; BL)</i>	BL
Μετά την πέψη-μετά τη φυγοκέντρηση και διαχωρισμό με 0,22 μm		SW-D		AW-D		BL-D
Διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa-μετά την πέψη		SW-D-P10		AW-D-P10		BL-D-P10
Διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa-μετά την πέψη		SW-D-P3		AW-D-P3		BL-D-P3

3.4 Μελέτη ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων βιοενεργών πεπτιδίων τυρογάλακτος και ΟΟΓ

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αποτελούν σημαντικό μέρος της έμφυτης ανοσίας και εμπλέκονται σε διεργασίες που παρατηρούνται κατά τη φλεγμονή και είναι ικανά να συνθέτουν και να εκκρίνουν προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Meydani and Ha, 2000). Πιο συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα είναι πρόδρομα κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος και η παραγωγή τους τοποθετείται στο μυελό των οστών. Διαφοροποιούνται σε μακροφάγα κατά τη φλεγμονή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους ιστούς (Chanput *et al.*, 2010).

3.4.1 THP-1: *In vitro* κυτταρικό μοντέλο για ανοσορύθμιση

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της ανοσιακής απόκρισης, τόσο των μονοκυττάρων όσων και των μακροφάγων-προερχόμενα από μονοκύτταρα (monocytes-derived macrophages) και ενεργοποιημένων μακροφάγων (activated macrophages), είναι η ανθρώπινη κυτταρική σειρά THP-1 λόγω των ομοιοτήτων με τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος *in vivo* (Daigneault *et al.*, 2010b; Genin *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2020).

3.4.1.1 Καλλιέργεια THP-1 κυτταρικής σειράς

Χρησιμοποιήθηκε η THP-1 κυτταρική σειρά, η οποία παραχωρήθηκε από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Η καλλιέργεια και επώαση των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από RPMI 1640 (Biosera), 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal bovine serum; FBS, Gibco), 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 1% πυροσταφιλικό νάτριο και 1% μη απαραίτητων αμινοξέων (Pan-Biotech). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων λάμβανε χώρα κάθε 2-3 ημέρες. Η διαδικασία καλλιέργειας, διαφοροποίησης και ενεργοποίησης της κυτταρικής σειράς THP-1 διεξήχθη σε θάλαμο νηματικής ροής και η επώαση σε όλες τις φάσεις έγινε στους 37° C με 5% CO₂.

3.4.1.2 Διαφοροποίηση THP-1 μονοκυττάρων σε μακροφάγα

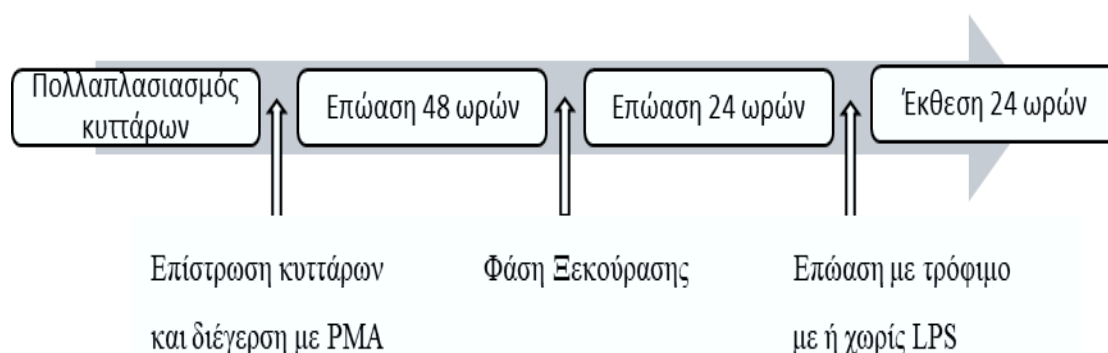
Οι συνθήκες έκθεσης των κυττάρων *in vitro* για αλλαγή της μορφολογικής τους κατάστασης, την προσκολλητική τους ικανότητα και συνολικά για τον έλεγχο μονοπατιών σηματοδότησης (signaling pathway) είναι μία πολύπλοκη και καθοριστικής σημασίας διαδικασία επιλογής του αντιδραστηρίων και του χρόνου επώασης (Chanput *et al.*, 2010).

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά έγινε επίστρωση $1,2 \times 10^6$ κυττάρων ($0,8 \times 10^6$ κύτταρα/ml) σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 12 θέσεων (12-well plates, SPL Life Sciences) με εμπλουτισμένο RPMI και εστέρα της φορβόλης (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA). Πιο συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα (M0) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 100 ng/mL PMA για 48 ώρες. Μετά από 48 ώρες, το εναιώρημα απορρίφθηκε, έγινε πλύση με PBS και προσθήκη εμπλουτισμένου RPMI 1640 για ακόμη 24 ώρες (rest phase-φάση «ξεκούρασης»). Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα εκτέθηκαν στα προϊόντα πέψης που περιέχουν πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3 kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3 με 3 mg πρωτεΐνη/mL και 0,9 mg πρωτεΐνη/mL αντίστοιχα). Για κάθε δείγμα, και για τα 2 υπό μελέτη υποπροϊόντα, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Να σημειωθεί πως τα τυφλά (BL-D-P3) δείγματα (πέψη χωρίς τρόφιμο) κατά την *in vitro* προσομοίωση πέψης ήταν ανάλογα των ημερών διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας (8 BL-D-P3 για το τυρόγαλα και 6 BL-D-P3 για τον ΟΟΓ) και έγιναν και σε αυτά 3 επαναλήψεις.

3.4.1.3 Διέγερση THP-1 μακροφάγων σε σε ενεργοποιημένα μακροφάγα

Η διέγερση των THP-1 μακροφάγων προκαλείται παρουσία ενδοτοξίνης (λιποπολυσακχαρίτης από το *E. coli* O111:B4; Lipopolysaccharide from *E. coli* O111:B4; LPS). Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία ενεργοποίησης των THP-1 μακροφάγων για πρόκληση ήπιας φλεγμονής, προκλήθηκε με ταυτόχρονη προσθήκη 100 ng/mL LPS και D-P3 (προϊόν πέψης <3kDa). Απεικονίζεται στην εικόνα 3.2 ένα διάγραμμα ροής που ήταν κοινό για τα δύο υπό μελέτη γαλακτοκομικά υποπροϊόντα.



Εικόνα 3.2 Διάγραμμα ροής διαφοροποίησης της THP-1 ανθρώπινης μονοκύτταρης σειράς σε μακροφάγα με PMA και διέγερσης των μακροφάγων με LPS

3.4.1.4 Απομόνωση ολικού RNA

Αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και πραγματοποιήθηκε λύση των προσκολλημένων κυττάρων με Nucleozol (Macherey-Nagel). Ακολούθησε κατακρήμνιση πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών με μεταφορά σε δοχείο τύπου Eppendorf, προσθήκη 120 μL DEPC Rnase – free H₂O, έντονη ανάδευση, επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (RT: room temperature) και φυγοκέντρηση (15 λεπτά/12000g/RT). Έπειτα, στο υπερκείμενο, όπου είναι διαλυμένο το RNA έγινε προσθήκη ίδιου όγκου ισοπροπανόλης, ανάδευση, επώαση 10 λεπτών σε RT και φυγοκέντρηση (10 λεπτά/12000g/RT) και το RNA είχε καθιζάνει. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκειμένου και πλύσεις με 80% αιθανόλη (Et-OH) για 3 λεπτά σε 12000g. Τέλος, έγινε ανασύσταση του RNA με DEPC Rnase – free H₂O, επώαση στους 65° C για 5 λεπτά και μέτρηση RNA στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Quawell, Q500). Στο Nanodrop αποτυπώνεται η συγκέντρωση του RNA καθώς επίσης και αξιολογείται η καθαρότητα των δειγμάτων από πρωτεΐνες, EDTA, φαινόλης κ.α, με τους λόγους O.D._{260/280} και O.D._{260/230}.

3.4.1.5 Καθαρισμός ολικού RNA με DNase I

Ο καθαρισμός του RNA έγινε με την εφαρμογή του ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση I (Dnase I, New England) το οποίο ευθύνεται για την αποδόμηση του DNA. Η DNase υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς 3' -5' δεσμούς μεταξύ των νουκλεοτιδίων του DNA και το EDTA, (Ethylene Diamine Tetracetic Acid: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) προστατεύει το RNA σε υψηλές θερμοκρασίες (δεσμεύοντας μέταλλα Ca²⁺, Mg²⁺).

Αναλυτικότερα, τοποθετήθηκαν 5000 ng ολικού RNA, 4 μL του DNase I Reaction buffer, 1 μL (2 units) DNase I και με τελικό όγκο 40 μL και επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στους 37 °C για 20 λεπτά. Εν συνεχεία, έγινε προσθήκη 5 mM EDTA και επώαση στους 75 °C για 10 λεπτά.

3.4.1.6 Κατακρήμνιση RNA

Ακολούθησε η κατακρήμνιση RNA με προσθήκη 1 μL γλυκογόνου (0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 4 μL οξικού αμμωνίου (0,1 M), 100 μL Et-OH (100%) και τοποθέτηση στους – 80°C για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα, ακολούθησε φυγοκέντρηση (12000 g/20 λεπτά/RT), αφαίρεση του υπερκειμένου, επανασύσταση του RNA εκ νέου μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο.

3.4.1.7 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription) είναι ενζυμική διαδικασία κατά την οποία το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) συντίθεται έχοντας ως εκμαγείο μια αλληλουχία RNA με ταυτόχρονη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο αντιδραστηρίων PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) και το πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, χρησιμοποιώντας ένα μίγμα από τυχαία εξαμερή, oligo-dT εκκινητές και προσθέτοντας 500 ng RNA. Ακολούθησε επώαση στον θερμικό κυκλοποιητή με τις ακόλουθες συνθήκες: 37°C/15 λεπτά (αντίστροφη μεταγραφή), 85°C/5 sec (απενεργοποίηση ενζύμου) και 4°C (ψύξη). Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20° C.

3.4.1.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q PCR)

Στο πλαίσιο αυτού του κεφαλαίου της διατριβής εξετάζονται τα επίπεδα της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή της ανοσιακής απόκρισης τόσο σε μακροφάγα (M0) όσο και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα (M1) της καρκινικής σειράς THP-1, ύστερα από την έκθεση τους στο κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (permeate 3kDa) και για τα δύο υποπροϊόντα (τυρόγαλα και ΟΟΓ). Οι αντιδράσεις qPCR έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του FastGene IC Green 2X qPCR Universal Mix (Nippon Genetics) σε SA cyclor 96 (Sacace).

Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PerlPrimer v.1.1.21 (Marshall, 2004) χρησιμοποιώντας αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του NCBI (Εθνικό κέντρο βιοτεχνολογικής πληροφορίας της Αμερικής) και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3.5. Επιλέγονται οι ακολουθίες που υβριδίζουν στην κωδικεύουσα περιοχή και των μεταγράφων και ένας από τους δύο εκκινητές να υβριδίζει κοντά σε σημείο ένωσης ιντρονίου/εξωνίου. Ως γονίδια αναφοράς (housekeeping genes) χρησιμοποιούνται τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37a* (Maeb, Sendelbach and Lorkowski, 2010).

Καμπύλη αναφοράς και αποδιάταξης

Για κάθε ζεύγος εκκινητών κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς (standard curve) με σειριακές αραιώσεις (1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:024) που προέρχονται από mix δειγμάτων cDNA. Δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις εκκινητών και η

καταλληλότητά τους αξιολογήθηκε μέσω της αποδοτικότητας (90% < efficiency < 110%) και της παραγωγής μοναδικού προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους (με βοήθεια melting curve ή/και gel αγαρόζης).

Πίνακας 3.5 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση σε THP-1 μακροφάγα και ενεργοποιημένα μακροφάγα

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινήτη ¹	Αποδοτικότητα (%)	Συγκέντρωση (nM)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αλληλουχία Στόχος
B2M	F: GCTATCCAGCGTACTCCA R: CTAACTATCTTGGGCTGTGAC	103	300	285	NM_004048.4
RPS18	F: CTGAGGATGAGGTGGAACG R: CAGTGGTCTTGGTGTGCT	98	300	240	NM_022551.3
HPRT1	F: CTTTGCTTTTCCTTGGTCAGG R: CAAATCCAACAAAGTCTGGCT	99	300	111	NM_000194.3
RPL37a	F: AGTACACTTGCTCTTTCTGTGG R: GGAAGTGGTATTGTACGTCAG	106	300	119	NM_000998.5
IL1B	F: CAGATGAAGTGCTCCTTCCAG R: CCTCGTTATCCCATGTGTCG	99	300	244	NM_000576.3
IL10	F: CATGCTTCGAGATCTCCGAG R: AACCCAGTAACCCCTAAAGTC	103	300	122	NM_000572.3
IL6	F: GGATTCAATGAGGAGACTTGC R: CATTGTGGTTGGGTCAGG	95	300	205	NM_000600.5
CXCL8	F: GCTAAAGAAGCTTAGATGTCAGTGC R: AACCTCTCCACAACCCCTCTG	97	300	191	NM_000584.4
TLR2	F: ATCAGCAGGAACAGAGCACA R: ACTCAGGAGCAGCAAGCAC	102	300	173	NM_001318793.2
TLR4	F: GATTTATCCAGGTGTGAAATCCAG R: TAGAGATGCTAGATTTGTCTCCAC	105	300	174	NM_003266.4
STAT1	F: TACACCTACGAACATGACCCCT R: ACCAACAGTCTCAACTTCACAG	109	300	188	NM_139266.3
STAT2	F: CCATCAGCCAACTGAAAGAC R: ATCCAGCACCTCCTTTCTC	104	300	161	NM_001385113.1 2
RELA	F: GGACTACGACCTGAATGCTG R: ACCTCAATGTCCTCTTTCTGC	105	300	228	NM_001404662.1
MYD88	F: GACCAAATTTGCACTCAGCCT R: AGACAGTGATGAACCTCAGGA	103	200	113	NM_001374787.1
CCL2	F: ATAGCAGCCACCTTCATTCC R: CAATGGTCTTGAAGATCACAGC	102	300	172	NM_002982.4 2
IRF5	F: GGAAATACACCGAAGGCGT R: ATCCTCTGCAGCTCTTCCT	108	300	244	NM_032643.5

<i>TNF</i>	F: TTCCTCAGCCTCTTCTCCT R: GAGGGTTTGCTACAACATGG	100	200	196	NM_000594.4
<i>TGFB1</i>	F: TGAACCCGTGTTGCTCTC R: TAGTGAACCCGTTGATGTCC	94	300	287	NM_000660.7
<i>LST1</i>	F: CGGAATGATGTAAAGAGGCTG R: AGGCATAGTCAGCTCTGG	103	300	187	NM_205838.3
<i>NFKB1</i>	F: GCACAAGGAGACATGAAACAG R: CCCAGAGACCTCATAGTTGTC	97	300	189	NM_001382627.1
<i>ICAM1</i>	F: CAGACCTTTGTCCTGCCA R: TCGTTGCCATAGGTGACTG	95	300	176	NM_000201.3
<i>NFE2L2</i>	F: GATCTGCCAACTACTCCCA R: GCCGAAGAAACCTCATTGTC	90	200	121	NM_006164.5
<i>HMOX1</i>	F: GCTTCAAGCTGGTGATGG R: AGCTCTTCTGGGAAGTAGAC	90	400	112	NM_002133.3
<i>SOD1</i>	F: CGAGCAGAAGGAAAAGTAATGG R: CCAAGTCTCCAACATGCC	95	300	194	NM_000454.5
<i>CAT</i>	F: TGCCTATCCTGACACTCACC R: GAGCACCACCCTGATTGTC	92	300	137	NM_001752.4
¹ : F: πρόσθιος εκκινητής, R: οπίσθιος εκκινητής					

Κάθε αντίδραση περιείχε 150-400 nM εκκινητών, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.5. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε εις διπλούν με 3 δείγματα-βαθμονομητές (intercalibrators) για κάθε ζεύγος εκκινητών που εξετάστηκε σε κάθε κλάσμα (τυρόγαλα και ΟΟΓ) και σε κάθε φαινότυπο (μακροφάγα και ενεργοποιημένα μακροφάγα). Τα δείγματα επωάστηκαν στους 95° C για 2 λεπτά (ενεργοποίηση του ενζύμου), ακολουθούμενη από 40 κύκλους από 5 sec στους 95° C (αποδιάταξη) και 30 sec στους 60° C (υβριδισμός εκκινητών). Τέλος, ακολούθησε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Τα σημεία διασταύρωσης (Cp) υπολογίστηκαν μέσα από το λογισμικό του οργάνου της Sacace. Ο γεωμετρικός μέσος όρος και των τεσσάρων γονιδίων αναφοράς λαμβάνεται υπόψιν για την κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.

3.4.2 RAW 264.7: *In vitro* κυτταρικό μοντέλο για αντιφλεγμονώδες δυναμικό

Η RAW 264.7 είναι μία κυτταρική σειρά μακροφάγων από Balb/c ποντικούς με όγκο όπου προέρχεται από τον ιό λευχαιμίας Abelson (Abelson murine leukemia virus) (Hartley *et al.*, 2008). Είναι κύτταρα του μυελού των οστών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να εκτελούν φαγοκυττάρωση. Πιο συγκεκριμένα, τα RAW 264.7 αποτελούν κυτταρικό μοντέλο για τη μελέτη μακροφάγων και ανάλογα με τον τύπο ενεργοποίησης, τα μακροφάγα ταξινομούνται ως υπομονάδα M1 ή M2 (Khabirou *et al.*, 2019). Τα μακροφάγα M1 που ενεργοποιούνται κλασικά (classically activated/κλασική οδός ενεργοποίησης) από την IFN γ ή/και LPS είναι προφλεγμονώδη κύτταρα, ενώ τα αντιφλεγμονώδη M2 μακροφάγα (alternatively activated/εναλλακτική οδός ενεργοποίησης) προκαλούνται από τις ιντερλευκίνες 4 και 10 (Taciak *et al.*, 2018).

3.4.2.1 Καλλιέργεια RAW 264.7 και διέγερση/ενεργοποίηση/πόλωση με LPS

Χρησιμοποιήθηκε η RAW 264.7 κυτταρική σειρά, η οποία παραχωρήθηκε από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε DMEM (Biosera) συμπληρωμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 1% πυροσταφιλικό νάτριο και 1% μη απαραίτητων αμινοξέων. Ανά 2-3 ημέρες λάμβανε χώρα η αποκόλληση των κυττάρων από το πιάτο με ειδική λαστιχένια ξύστρα (SPL Life Sciences) και εν συνεχεία η ανακαλλιέργειά τους. Όλες οι διαδικασίες διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής και στους 37°C με 5% CO $_2$.

Η *in vitro* διέγερση των μακροφάγων των RAW 264.7 πραγματοποιήθηκε με LPS σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο DMEM και σε συνθήκες 5% CO $_2$, στους 37°C. Μετά από 24 ώρες αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο για τη δοκιμή Griess και ταυτόχρονα απομονώθηκε το RNA των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με ανοσιακό σύστημα.

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά έγινε επίστρωση $0,5 \times 10^5$ κυττάρων ($0,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml) σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων (96-well plates, Kisker) με ενισχυμένο DMEM για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, στα προσκολλημένα πλέον κύτταρα έγινε πλύση με PBS, προσθήκη 1000 ng/mL LPS σε DMEM χωρίς κόκκινη φαινόλη (DMEM-phenol red, PAN-Biotech) με 10% FBS για ακόμη 24 ώρες. Μαζί με το LPS (co-incubation), τα κύτταρα εκτίθενται στα προϊόντα πέψης που περιέχουν πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3 kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3 με 3 mg πρωτεΐνη/mL και 0,9 mg

πρωτεΐνη/mL αντίστοιχα). Όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν τέσσερις φορές (μέσα στην ίδια πλάκα) και εις τετραπλούν (τέσσερις διαφορετικές ημέρες, διαφορετικό passage) με πρότυπη καμπύλη νιτρώδους νατρίου (sodium nitrite; NaNO_2) να κατασκευάζεται ανά πλάκα. Να σημειωθεί πως είχε προηγηθεί mix των BL-D-P3 (πέψη χωρίς τρόφιμο) και προσδιορίστηκαν και αυτά όπως τα υπόλοιπα δείγματα.

3.4.2.2 Προσδιορισμός Griess–Αναστολή Νιτρικού οξέος

Η μέθοδος Griess είναι μία έμμεση προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση του νιτρικού οξέος (nitric oxide; NO) και βασίζεται στην παραδοχή ότι το NO ως ασταθές μόριο μετατρέπεται στην πιο οξειδωμένη μορφή των νιτρωδών ιόντων (NO_2^-), και σε μερικές περιπτώσεις σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Griess των Pinto *et al.* με μερικές τροποποιήσεις, χρησιμοποιώντας ως ερέθισμα το LPS (Schmölz, Wallert and Lorkowski, 2017; Müller *et al.*, 2019) και είναι μία αντίδραση δύο σταδίων και είχε περιγραφεί πρώτη φορά από τον Griess το 1879 (Pinto *et al.*, 2020).

Αναλυτική πορεία:

Την επόμενη μέρα της επώασης των κυττάρων με LPS και προϊόντος πέψης με πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3), τα 100 μL του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε νέα πλάκα 96 θέσεων και έγινε προσθήκη 50 μL σουλφανιλαμίδης (1% sulfanilamide σε Milli q νερό) και επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε RT. Έπειτα, κάθε αντίδραση συμπληρώθηκε με 50 μL N-(1-Naphthyl) ethylenediamine (10% NED σε 5% διαλύμα φωσφορικού οξέος) και επώαστηκε για 10-30 λεπτά στο σκοτάδι σε RT. Τέλος, μεταφέρθηκε η πλάκα σε φωτόμετρο, ακολούθησε μέτρηση στα 540 nm και ποσοτικοποίηση σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη NaNO_2 (1,56 μM -100 μM).

3.4.2.3 Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των προϊόντων πέψης με πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3kDa (permeate 3kDa) στη λειτουργία ανοσορύθμισης προσδιορίστηκε η έκφραση γονιδίων με qPCR.

Να αναφερθεί πως πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA μίας βιολογικής επανάληψης (από 1 ημέρα) από δεξαμενή 4 βοθρίων της πλάκας των υπό μελέτη δειγμάτων και τυφλών. Η απομόνωση ολικού RNA μέχρι τον σχηματισμό cDNA πραγματοποιείται ως παρουσιάζεται αναλυτικά στα υποκεφάλαια 3.4.1.4 έως 3.4.1.7. Η επίδραση προϊόντων πέψης με πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3kDa (SW-D-P3 και AW-D-

P3) σε ενεργοποιημένα μακροφάγα αξιολογήθηκε σε επίπεδο mRNA για γονίδια με προ-ή/και αντιφλεγμονώδη δράση και ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν η *ACTB* και *CYCL* (πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR πραγματικού χρόνου για τη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση σε RAW 264.7 ενεργοποιημένα μακροφάγα

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητή ¹	Αποδοτικότητα (%)	Συγκέντρωση (nM)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αλληλουχία αναφοράς
<i>Actb</i>	F: GAAGATCAAGATCATTGCTCCTC R: GGACTCGTCATACTCCTGC	95	300	121	NM_007393.5
<i>Cycl</i>	F: CTAACCTGAGGCTGCAAGA R: GCCAGTGAGCAGGGAAAATA	110	300	113	NM_025567.3
<i>Nos2</i>	F: GGAACATCCCAAATACGAGTG R: TTCTGCTTCTGGAAACTATGGA	110	300	297	NM_001313921.1
<i>Ptgs2</i>	F: CTCAGCCATACAGCAAATCCT R: GGACTGTCAATCAAATGTGATCTG	106	300	299	NM_011198.5
<i>Tnf</i>	F: CAGATGAAGTGCTCCTTCCAG R: CCTCGTTATCCCATGTGTCG	114	300	164	NM_001278601.1
<i>Ilf6</i>	F: CTCTGCAAGAGACTTCCATCC R: TCTCATTTCCACGATTTCCAG	86	300	187	NM_001314054.1
<i>1</i> :F: πρόσθιος εκκινητής, R: οπίσθιος εκκινητής					

3.5 Μελέτη αντιυπερτασικών ιδιοτήτων

3.5.1 Προσδιορισμός της ACE ανασταλτικής ιδιότητας (ACE inhibitory activity)

Η ανασταλτική δράση του ενζύμου μετατροπής αγγιοτενσίνης I (ACE; Angiotensin converting enzyme I) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Shalaby και συνεργάτες (Shalaby, Zakora and Otte, 2006; Otte *et al.*, 2007) με μερικές τροποποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκε το FA-PGG (furanacroyl-Phe-Glu-Glu, Sigma) ως συνθετικό υπόστρωμα και το ένζυμο μετατροπής της αγγιοτενσίνης από πνεύμονα κουνελιού (Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung, Sigma). Με λίγα λόγια, η ανάλυση βασίζεται σε μια χημική αντίδραση μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος, όπου το FAP-GG υδρολύεται από το ACE προς σχηματισμό FAP και το διπεπτίδιο GG και αυτό συνεπάγεται τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm (López-Fandiño, Otte and van Camp, 2006a; Sangsawad *et al.*, 2022). Να σημειωθεί πως η ACE ανασταλτική δράση συνδέεται με τα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια που προκύπτουν από τη γαστρεντερική πέψη, για αυτό και μελετήθηκαν τόσο για το τυρόγαλα όσο και για τον ΟΟΓ τα D-P10 και D-P3 κλάσματα (Barac *et al.*, 2019b).

3.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα υδατοδιαλυτά κλάσματα (water-soluble fraction) όλων των λυοφιλιωμένων δειγμάτων και για τα 2 υποπροϊόντα, πριν υποστούν *in vitro* γαστρεντερική πέψη. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (15 λεπτά/15000 g/25° C) και διαχωρισμός των φάσεων, όπου αποτελείται από 3 φάσεις, με ανώτερη φάση να είναι ένα λεπτό στρώμα λίπους, το ίζημα να είναι ένα αδιάλυτο μέρος κυρίως των καζεϊνών και η μεσαία φάση να είναι το υδατοδιαλυτό κλάσμα (Tarango-Hernández *et al.*, 2015; Sultan *et al.*, 2017).

3.5.3 Έλεγχος καπτοπρίλης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μεθόδου με τη χρήση της καπτοπρίλης (captopril), η οποία είναι ανταγωνιστικός αναστολέας του ACE. Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας και της επαναληψιμότητας της αντίδρασης, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη της καπτοπρίλης με 5 σημεία σε τελικές συγκεντρώσεις 1, 3, 9, 18, 27 nM. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το buffer της αντίδρασης. Η τιμή IC₅₀ για την καπτοπρίλη ήταν 9 nM. Αυτή η τιμή είναι σε συμφωνία με τις τιμές που αναφέρονται πρόσφατα σε αρκετές μελέτες (Vermeirssen, Van Camp and Verstraete, 2002; Hou, Chen and Lin, 2003; Murray, Walsh and FitzGerald, 2004).

3.5.4 Προσδιορισμός της ACE ανασταλτικής δράσης με FAP-GG ως υπόστρωμα

Σε κάθε φρεάτιο έγινε προσθήκη 13,5 μL δείγματος (30 mg πρωτεΐνης /mL και 9 mg πρωτεΐνης /mL για τυρόγαλα και ΟΟΓ αντίστοιχα) και 100 μL προθερμασμένου (37 $^{\circ}\text{C}$, 15 λεπτά) υποστρώματος FAP-GG συγκέντρωσης 0,88 mM (διαλυμένο σε 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 300 mM NaCl). Η πλάκα επώαστηκε στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά και ακολούθησε προσθήκη 10 μL του ενζυμικού διαλύματος ACE (0,1 Unit/mL). Η αντίδραση εκκινεί με την προσθήκη του ενζύμου και η πλάκα μεταφέρεται στο φωτόμετρο Epoch 2, B (ρυθμισμένο στους 37 $^{\circ}\text{C}$). Η καταγραφή της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε στα 340 nm κάθε λεπτό για τα πρώτα 40 λεπτά.

Τα υπό μελέτη κλάσματα για πιθανή αντιυπερτασική δράση είναι το υδατοδιαλυτό κλάσμα πριν την πέψη καθώς και δύο κλάσματα που προκύπτουν μετά την πέψη, δηλαδή το κλάσμα που περιλαμβάνει πεπτίδια μοριακού βάρους μικρότερα από 10 kDa (permeate 10 kDa) και 3 kDa (permeate 3 kDa) τόσο για το τυρόγαλα όσο και για τον ΟΟΓ. Για το κάθε δείγμα προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων μέσα στην ίδια πλάκα μέτρησης και για 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις (3 διαφορετικές ημέρες). Επίσης, σε κάθε πλάκα προσδιορίστηκε ο μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων του μάρτυρα (control; buffer αντί δείγματος). Η κλίση της καμπύλης ($\Delta A_{340}/\text{λεπτό}$) της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο αποτελεί άμεσο μέτρο της κινητικής του ενζύμου και λαμβάνεται, κατά προτίμηση, το γραμμικό διάστημα από το 5 $^{\circ}$ -35 $^{\circ}$ λεπτό και κατ'ελάχιστον για 15 λεπτά για τον υπολογισμό της ανασταλτικής δράσης του. Η ανασταλτική δράση του ACE υπολογίστηκε βάσει του τύπου $[1 - (\Delta A_{\text{δείγματος}} / \Delta A_{\text{μάρτυρα}})] \times 100\%$.

3.6 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης

3.6.1 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας των ριζών οξυγόνου με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescence)

Η μέθοδος ORAC αναπτύχθηκε αρχικά από τους Cao, Alessio, and Cutler (Cao, Alessio and Cutler, 1993) και συνίσταται στη μέτρηση της μείωσης του φθορισμού μίας πρωτεΐνης (β-φυκοερυθρίνη) ως αποτέλεσμα της απώλειας του σχηματισμού της όταν υφίσταται οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από μια πηγή ριζών υπεροξειδίου (ROO·). Η ORAC-FL, χρησιμοποιεί την φλουορεσκεΐνη (FL) αντί της β-φυκοερυθρίνης ως «φθορισμό-ανιχνευτή» και είναι μια βελτιωμένη μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Ou και τους συνεργάτες του (Ou, Hampsch-Woodill and Prior, 2001). Η μέθοδος μετρά την ικανότητα του αντιοξειδωτικού στο δείγμα να προστατεύει την πρωτεΐνη-στόχο (φλουορεσκεΐνη) από οξειδωτική βλάβη (Ou, Hampsch-Woodill and Prior, 2001; Prior *et al.*, 2003; Prior, Wu and Schaich, 2005).

Αναλυτική πορεία:

Η αντίδραση διεξήχθη στους 37° C, καθώς η αντίδραση αρχίζει με τη θερμική διάσπαση του AAPH (75 mM, PBS, pH 7,4), λόγω της ευαισθησίας της FL στο pH (Zulueta *et al.*, 2009; Zulueta, Esteve and Frígola, 2009). Ο αυτοματοποιημένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε στο VICTOR X3 (Perkin Elmer) MultiLabel Plate Reader, με φίλτρα φθορισμού (διέγερση στα 485 nm/εκπομπή στα 535 nm) και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες με 96 διαφανή βοθρία και επίπεδο πυθμένα (Kisker).

48 δείγματα τυρογάλακτος και 33 δείγματα ΟΟΓ πριν (SW και AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D και AW-D), καθώς και τα προϊόντα της πέψης με πεπτίδια μοριακού βάρους κάτω των 3 kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3) αναλύθηκαν. Αρχικά, τα δείγματα για να είναι διαυγή και να αποφευχθούν παρεμβολές στη μέθοδο λόγω μεγάλης ευαισθησίας, δοκιμάστηκαν αραιώσεις με την κατάλληλη να είναι 1:30 και 1:20 για τα δείγματα τυρογάλακτος και ΟΟΓ αντίστοιχα. Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Trolox (υδρόφιλο ανάλογο βιταμίνης E). Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς 5 σημείων (3,125 μM-50 μM), παρασκευαζόταν σε καθημερινή βάση και σε κάθε πλάκα (96-well plate) ξεχωριστά με διαδοχικές αραιώσεις.

Αρχικά, γινόταν προσθήκη 20 μL δειγμάτων/PBS/Trolox στα βοθρία και σε απόλυτο σκοτάδι γινόταν εν συνεχεία η προσθήκη 120 μL της FL (117 nM) και η πλάκα επωαζόταν στους 37° C για 15 λεπτά. Ύστερα, γινόταν προσθήκη 60 μL AAPH (40 mM), για την εκκίνηση της αντίδρασης. Οι μετρήσεις καταγράφονταν κάθε λεπτό για 60 λεπτά συνολικά μέχρι η σχετική ένταση του φθορισμού (FL%) να είναι κάτω από το 5% της αρχικής.

Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκάστοτε κλάσματος, προσδιορίστηκε συγκρίνοντας την περιοχή κάτω από την καμπύλη μείωσης του φθορισμού (AUC-area under the curve) του δείγματος με αυτήν του μάρτυρα (control-PBS), όπου δεν περιείχε αντιοξειδωτικό (Dávalos, Gómez-Cordonés and Bartolomé, 2004). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των 2 πλακών (ανεξάρτητες μετρήσεις) με κάθε δείγμα να έχει 3 επαναλήψεις μέσα στο πιάτο. Οι τιμές ORAC των αξιολογούμενων δειγμάτων περιγράφονται ως $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης.

3.6.2 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα 2,2' αζινο-δις-[3-αιθυλοβενζολινο-6-σουλφονικού οξέος] ([2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]; ABTS)

Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε από τους Miller *et al.* (Miller *et al.*, 1993) και εξελίχθηκε αργότερα από τους Re *et al.* (Re *et al.*, 1999). Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Τα υπό μελέτη αντιοξειδωτικά προστίθενται σε διάλυμα που περιέχει τη ρίζα του ABTS και με την έλευση ορισμένου χρόνου, η εναπομένουσα ρίζα $\text{ABTS}^{\cdot+}$ προσδιορίζεται ποσοτικά με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας $\text{ABTS}^{\cdot+}$ που προκαλείται από την αντιοξειδωτική ουσία είναι εφάμιλλη της μείωσης που προκαλεί το αντιοξειδωτικό Trolox, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Τα αξιολογούμενα δείγματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης.

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά, όλα τα δείγματα τυρογάλακτος αραιώθηκαν 3 φορές (10 mg πρωτεΐνης/ml) και στα SW-D και SW-D-P3 πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:2. Στα αντίστοιχα κλάσματα ΟΟΓ δεν ήταν απαραίτητη κάποια αραιώση.

Αναλυτικότερα, σε διάλυμα 7 mM ABTS διαλυμένο σε νερό, προστέθηκε υπερθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) με συγκέντρωση 2,45 mM και επώαστηκε για 16 ώρες (1:1) σε

σκοτάδι και σε RT, ώστε να προκύψει ένα βαθύ κυανό διάλυμα. Έπειτα, το διάλυμα αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (pH 7,4), έως ότου η απορρόφηση στα 734 nm να είναι $0,7 \pm 0,02$. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του διαλύματος ABTS \cdot^+ όγκου 230 μL με 20 μL δείγμα/DMSO/Trolox σε κάθε φρεάτιο και ακολούθησε επώαση 1 ώρας σε RT και μέτρηση στα 734 nm (García-Casas *et al.*, 2022). Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Trolox παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις από stock διάλυμα συγκέντρωσης 1 mM, 5 διαλύματα (0,27 μM -4,34 μM). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες με 96 διαφανή βοθρία με επίπεδο πυθμένα (Kisker) και τα δείγματα εκφράζονται σε $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης. Όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν τουλάχιστον δύο φορές (μέσα στην ίδια πλάκα) και εις τριπλούν (τρεις διαφορετικές ημέρες) με ξεχωριστή καμπύλη προτύπου να κατασκευάζεται ανά πλάκα.

3.6.3 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δράσης (ferric reducing antioxidant power; FRAP)

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Benzie *et al.* (Benzie and Strain, 1996) και βασίζεται στην ικανότητα του δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη ($\text{Fe}^{3+} + \text{TPTZ}$) σε δισθενή σίδηρο ($\text{Fe}^{2+} + \text{TPTZ}$) με έντονο κυανό χρώμα στα 590 nm. Η μέθοδος FRAP απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, μεταξύ άλλων, το όξινο περιβάλλον (pH 3,6) και τη θερμοκρασία των 37 °C, για τη διατήρηση διαλυτότητας του σιδήρου (Wojtunik-Kulesza, 2020). Το χαμηλό pH μειώνει το δυναμικό ιονισμού, όπου οδηγεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων και την αύξηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής, προκαλώντας μια μετατόπιση της αντίδρασης του κυρίαρχου μηχανισμού. Η μέθοδος FRAP χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων δειγμάτων που εμπεριέχουν τόσο λιπόφιλες όσο και υδρόφιλες αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά, στα δείγματα SW πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:3 και στα SW-D και SW-D-P3 πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:2, ενώ στον ΟΟΓ δεν ήταν απαραίτητη η αραιώση των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τον Wu και τους συνεργάτες του (Wu *et al.*, 2021) με μικρές διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, προετοιμαζόταν σε καθημερινή βάση το αντιδραστήριο FRAP αναμειγνύοντας 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (300 mM σε οξικό οξύ και pH 3,6) με 2,5 mL διάλυμα τρισθενούς χλωριούχου σιδήρου (20 mM FeCl_3 σε νερό) και 2,5 mL διάλυμα

TPTZ (10 mM TPTZ σε 40 mM HCl) και το μείγμα επωαζόταν στους 37° C για 1 ώρα σε σκιερό μέρος για αποφυγή φωτο-οξειδωσης (Corrochano *et al.*, 2019). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη και ως πρότυπο αντιοξειδωτικό το Trolox. Η τιμή της απορρόφησης είναι ανάλογη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πεπτιδίων, τα οποία ανάγουν τον σίδηρο από τρισθενή σε δισθενή. Ειδικότερα, για την έναρξη της αναγωγικής αντίδρασης, 150 μ L μείγματος FRAP αναμειχθηκαν με 20 μ L του δείγματος /μεθανόλης /Trolox και επώαστηκαν στους 37° C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της 1 ώρας, γινόταν μέτρηση στα 590 nm. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Trolox παρασκευάζονταν 6 διαδοχικές αραιώσεις (από stock διάλυμα συγκέντρωσης 1 mM) σε εύρος συγκεντρώσεων 0,18 μ M -5,88 μ M. Σε όλα τα κλάσματα λήφθηκε μέτρηση εις διπλούν (μέσα στην ίδια πλάκα) και τουλάχιστον 3 φορές (σε τρεις διαφορετικές ημέρες). Πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση με το Trolox ως πρότυπη ουσία στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις ανά πλάκα και τα δείγματα εκφράστηκαν σε μ mol ισοδύναμο Trolox/g πρωτεΐνης.

3.6.4 Δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής ισχύος (P-FRAP;reducing power)

Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας κάθε κλάσματος, εφαρμόστηκε η μέθοδος των Yen and Chen (Yen and Chen, 1995) με μερικές διαφοροποιήσεις (Canabady-Rochelle *et al.*, 2015). Η μέθοδος P-FRAP (potassium ferricyanide reducing power) συσχετίζει την αύξηση της απορρόφησης με την αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού. Οι ενώσεις με αντιοξειδωτική ικανότητα αντιδρούν με το σιδηροκυανιούχο κάλιο [$K_3Fe(CN)_6$],το οποίο και αντιδρά με τον τριχλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$), αποδίδοντας ένα μπλε χρωματισμένο σύμπλεγμα (prussian blue-σιδηροκυανιούχο σίδηρο) με μέγιστη απορρόφηση στα 700 nm (Pisoschi and Negulescu, 2012).

Αναλυτική πορεία:

Αρχικά, όλα τα δείγματα τυρογάλακτος [πριν (SW) και μετά (SW-D και SW-D-P3) την *in vitro* προσομοίωση πέψης] αραιώθηκαν 1:6 (5 mg πρωτεΐνης/ml). Το κλάσμα AW αραιώθηκε 1:4 (2,25 mg πρωτεΐνης/ml) και τα κλάσματα μετά την πέψη, AW-D και AW-D-P3, αραιώθηκαν 1:2. Για την P-FRAP, πραγματοποιήθηκε επώαση 50 μ L PBS (0,2 M, pH 6,6 ρυθμιστικό διάλυμα) μαζί με 50 μ L σιδηροκυανιούχο κάλιο 1% [$K_3Fe(CN)_6$] και 50 μ L δείγματος/μάρτυρα/προτύπου στους 50 °C για 20 λεπτά με κίνηση. Ύστερα, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 50 μ L τριχλωρικού οξέος 10% (TCA)

και 10 μL τριχλωριούχου σιδήρου 0,1% (FeCl_3) και επώαση στους 50 °C για 10 λεπτά με κίνηση. Μετά το πέρας της επώασης, λαμβάνεται μέτρηση στα 700 nm. Για την P-FRAP, ως πρότυπο χρησιμοποιείται το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και ως μάρτυρας το νερό. Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας κάθε κλάσματος κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη BHT (0-100 μM) σε κάθε πλάκα. Κάθε δείγμα αντιπροσωπεύει 2 επαναλήψεις στην ίδια πλάκα και εις τριπλούν (3 διαφορετικές ημέρες). Τέλος, τα δείγματα εκφράστηκαν ως μmol ισοδύναμο BHT/g πρωτεΐνης.

3.6.5 Δοκιμή αντιοξειδωτικής δράσης πεφθέντων κλασμάτων χαμηλού μοριακού βάρους (digested retentate 3kDa) στην κυτταρική σειρά HT-29

3.6.5.1 Καλλιέργεια καρκινικής κυτταρικής σειράς HT-29

Για την επίτευξη της *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου HT-29, που προσφέρθηκε από το Εργαστήριο Κυτταρικής Τεχνολογίας του ΓΠΑ.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM 1640 (Biosera) εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin, Biosera), 1 mM πυροσταφυλικού νατρίου (Sodium pyruvate, Biosera), 2 mM L-γλουταμίνης (L-glutamine, Biosera) και 1% από διάλυμα με μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-essential amino acids; Biosera) και διατηρήθηκαν στους 37 °C με 5% CO_2 . Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.6.5.2 Απόψυξη κυττάρων

Αρχικά, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το υγρό άζωτο (-196° C) στους 37° C, έγινε προσθήκη DMEM, φυγοκέντρηση (5 λεπτά/1500g/25°C) για απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού DMSO. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε εμπλουτισμένο DMEM. Τέλος, ακολούθησε παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο και τοποθέτηση σε επωαστικό θάλαμο (37° C, 5% CO_2).

3.6.5.3 Ανακαλλιέργεια (split) κυττάρων

Η κυτταρική σειρά HT-29 ανήκει στις καλλιέργειες προσκόλλησης όπου ο πολλαπλασιασμός αναστέλλεται μόλις καλυφθεί μεγάλο μέρος της επιφάνειας από κύτταρα (>80% confluency). Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του DMEM, ακολούθησε πλύση με PBS, προσθήκη τρυψίνης (Pan-Biotech) και επώαση για 3-5 λεπτά. Έπειτα,

έγινε προσθήκη DMEM για την απενεργοποίηση της τρυψίνης και φυγοκέντρηση (5 λεπτά/1500g/25°C). Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε νέο θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα αναδεύτηκαν για τη διάσπαση τυχόν συσσωματωμάτων. Τέλος χωρίστηκαν σε πιάτα ή/και φλάσκες καλλιέργειας (SPL Life Sciences).

3.6.5.4 Καταμέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πλάκας Neubauer και του διαλύματος Trypan blue (0,2% σε PBS). Η χρωστική αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό νεκρών και ζωντανών κυττάρων. Αδυνατεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, σε αντίθεση με τα νεκρά κύτταρα που χρωματίζονται. Αναλυτικότερα, όγκος κυττάρων που περιέχεται στο εναιώρημα, μεταφέρθηκε σε δοχείο τύπου Eppendorf και αραιώνεται με PBS. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων ανά mL υπολογίστηκε από τον κάτωθι τύπο: Αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο x Αραίωση x 10^4 .

3.6.5.5 Επίστρωση κυττάρων για έλεγχο κυτταροτοξικότητας

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων παρουσία H_2O_2 .

Πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων HT-29 με συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα ανά κελί (50.000 κύτταρα/100 μ L) σε πλάκα 96 θέσεων (SPL Life Sciences) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και 5% CO_2 . Έπειτα, ακολούθησε πλύση με PBS και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0-2 mM) για άλλες 24 ώρες υπό συνθήκες 37°C και 5% CO_2 (Piccolomini *et al.*, 2012). Την επόμενη μέρα, έγινε προσθήκη 0,5 mg/mL MTT (αραιωμένο σε DMEM) αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί το υπερκείμενο. Η πλάκα τοποθετήθηκε για 1-3 ώρες στους 37°C, με σκοπό τον σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης ενδοκυτταρικά. Τέλος, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγινε προσθήκη 100 μ L DMSO για 20 λεπτά για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και σχηματισμού του μωβ/ιώδους χρώματος. Ακολούθησε φωτομέτρηση της πλάκας στα 570 nm (Tecan Infinite M200 Pro). Τέλος, η κάθε επέμβαση (διάφορες συγκεντρώσεις H_2O_2) συγκρίθηκε με τα control κύτταρα (απουσία H_2O_2) και τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας εκφράστηκαν ως ποσοστό των κυττάρων control. Το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

3.6.5.6 Ανίχνευση παραγωγής ROS με DCFH-DA παρουσία H₂O₂-CAA

Η μέθοδος CAA (cellular antioxidant activity) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) παρακολουθούνται με τη χρήση της DCFH-DA ως πρόδρομο φθορίζουσα χρωστική (Feng *et al.*, 2019). Η καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς HT-29 πραγματοποιήθηκε σε πλάκες 96 θέσεων με τις εξωτερικές θέσεις περιμετρικά να παραμένουν κενές (Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Τα κύτταρα παρέμειναν για 24 ώρες στον επωαστικό θάλαμο, με 100 μ L πλήρους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM (50.000 κύτταρα/κελί). Έπειτα, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS. Έγινε προσθήκη H₂O₂ τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM, μαζί (SW-D-P3 και AW-D-P3) και επώαστηκαν για 20-22 ώρες. Να σημειωθεί πως για τη μέθοδο CAA, στο προαναφερθέν κλάσμα εφαρμόστηκε λυοφιλίωση και ανασύσταση σε DMEM με αποτέλεσμα η συγκέντρωση πρωτεΐνης να είναι 45 mg/mL και 15mg/mL για τα δείγματα τυρογάλακτος και ΟΟΓ αντίστοιχα. Έπειτα, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, έγινε πλύση με PBS και προσθήκη 100 μ L συγκέντρωσης 10 μ M του αντιδραστηρίου DCFH-DA (διαλυμένη σε μεθανόλη) για 20 λεπτά. Μετά από 3 συνεχείς πλύσεις με PBS και προσθήκης 100 μ L PBS, ακολούθησε η τοποθέτηση της πλάκας σε φθορίζόμετρο VICTOR X3 (Perkin Elmer) ρυθμιζόμενο στους 37°C. Λήφθηκαν μετρήσεις σε μήκος κύματος διέγερσης τα 485 nm και εκπομπής τα 535 nm κάθε λεπτό και για 40 επαναλήψεις. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν (διαφορετικές ημέρες και διαφορετική γενεά-passage κυττάρων) τόσο για το SW-D-P3 όσο και για το AW-D-P3 με τα αντίστοιχα BL-D-P3. Η μέτρηση για κάθε δείγμα έγινε από 3 κελιά, για το τυφλό (blank-απουσία δείγματος και H₂O₂) από 6 κελιά και για το μάρτυρα (control-απουσία δείγματος και παρουσία H₂O₂) από 8 κελιά και υπολογίστηκε η μέση τιμή για κάθε επέμβαση ανά πλάκα.

3.7 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που πρόκυψαν στην παρούσα διατριβή έγινε με το πρόγραμμα SPSS για τα Windows Statistical Package Program, version 22.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών που συγκεντρώθηκαν με Kolmogorov-Smirnov για όλες τις μεθόδους. Αν τα συνεχή δεδομένα δεν κατανέμονταν κανονικά, επιχειρήθηκαν μετασχηματισμοί όπως $y = \log y$ ή μια προσέγγιση δύο βημάτων για τον μετασχηματισμό των συνεχών μεταβλητών σε κανονική κατανομή (Templeton and

Templeton, 2011). Ως ακολούθως, τα μετασχηματισμένα δεδομένα προσέγγισαν την κανονική κατανομή. Για τις συνεχείς παραμέτρους που ακολουθούν την κανονική κατανομή, εφαρμόστηκε η παραμετρική δοκιμασία t-test για τη σύγκριση των μέσων τιμών δύο πληθυσμών, όπως είναι ο παράγοντας της εποχικότητας. Για την εξέταση της ζωικής προέλευσης καθώς και της γεωγραφικής προέλευσης των υποπροϊόντων έγινε με την Ανάλυση Διασποράς με έναν παράγοντα (one-way Analysis of variance; one-way ANOVA) και στατιστικά σημαντικά διαφορές ($p \leq 0.05$) αναλύθηκαν περαιτέρω και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το κριτήριο Tukey ή Games-Howell. Αν ο έλεγχος της ομοιογένειας της διασποράς με το test του Levene ήταν στατιστικώς ασήμαντος (διασφάλιση της εγκυρότητας της ανάλυσης διακύμανσης) χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Tukey. Σε αντίθετη περίπτωση έγινε έλεγχος Welch και χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Games-Howell. Για τις βιοχημικές μεθόδους (ORAC, FRAP, P-FRAP, ABTS) που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή εφαρμόστηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney για τη σύγκριση των διαμέσων τιμών μεταξύ δυο μεταβλητών, όταν ο υπό εξέταση παράγοντας είναι η εποχικότητα (καλοκαίρι-χειμώνας), ενώ για τα υπόλοιπα εφαρμόστηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Η συλλογή όλων των δεδομένων της περιγραφικής στατιστικής ανάλυσης έγινε με το SPSS και έπειτα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.) για τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό πως τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν μία πλούσια πηγή σε πρωτεϊνικά προϊόντα με ισχυρή βιολογική δράση. Στην παρούσα διατριβή, αξιολογήθηκαν οι ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές δράσεις του τυρογάλακτος (υποπροϊόν παραγωγής τυριού) και του ΟΟΓ (υποπροϊόν παρασκευής στραγγιστής γιαούρτης).

4.1 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ, μετά από κατάλληλη *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερική πέψη (κλάσμα SW-D-P3 και AW-D-P3 αντίστοιχα) στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά THP-1 και την κυτταρικής σειρά μυός RAW 264.7. Επίσης, αξιολογήθηκαν η επίδραση της ζωικής προέλευσης, της γεωγραφικής προέλευσης και της εποχικότητας (στάδιο γαλακτικής περιόδου) στις ανωτέρω ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων.

4.1.1 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης για το τυρόγαλα

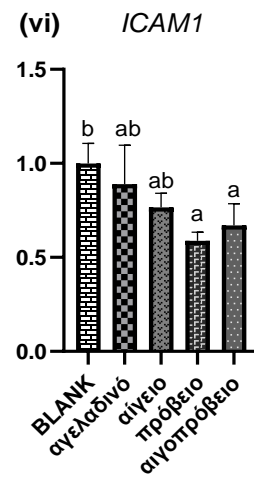
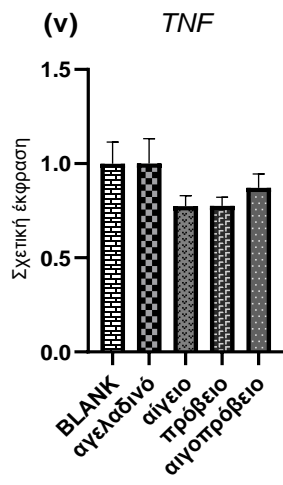
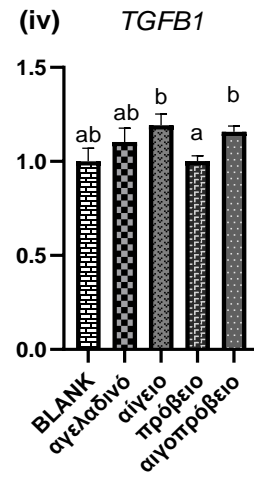
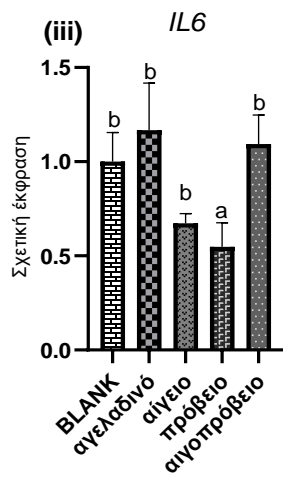
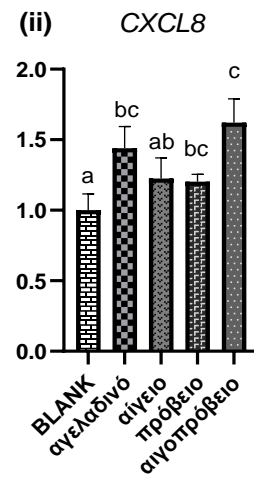
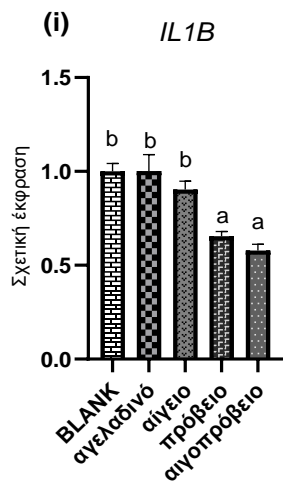
Προσδιορίστηκε η επίδραση επώασης των THP-1 μακροφάγων παρουσία SW-D-P3 στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή ανοσιακής απόκριση πριν (υποκεφάλαιο 4.1.1.1) και μετά από πρόκληση των κυττάρων με χρήση LPS (υποκεφάλαιο 4.1.1.2). Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ιντερλευκινών (*IL1B*, *IL6*), χημειοκινών (*CXCL8*), μεταγραφικών παραγόντων (*NFKB1*, *RELA*), ενεργοποιητών της μεταγραφής (*STAT1*, *STAT2*), υποδοχέων (*TLR2*, *TLR4*, *IRF5*) και μορίων που εμπλέκονται στην ανοσιακή ρύθμιση (*MYD88*, *ICAM1*, *LST1*) σε διαφοροποιημένα μακροφάγα (M0 φάση) καθώς και σε διαφοροποιημένα και ενεργοποιημένα (έκθεση με 100 ng/mL LPS για πρόκληση ήπιας φλεγμονής) THP-1 μακροφάγα. Επίσης, εξετάστηκαν και τα αντιοξειδωτικά γονίδια *NFE2L2*, *HMOX1*, *SOD1* *CAT*. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ακόμη ένα *in vitro* κυτταρικό μοντέλο, για τη διερεύνηση του αντιφλεγμονώδους δυναμικού, των RAW 264.7, που αναλύεται εκτενέστερα στα υποκεφάλαια 4.1.1. και 4.1.1.4

4.1.1.1 Γονιδιακή έκφραση σε μη ενεργοποιημένα THP-1 μακροφάγα

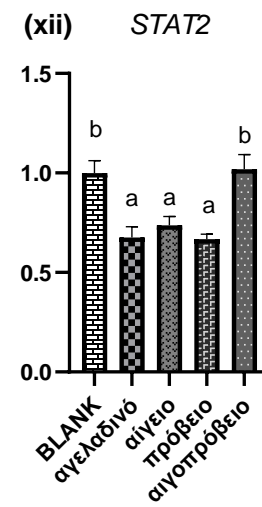
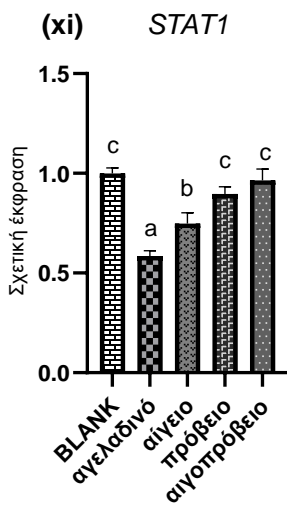
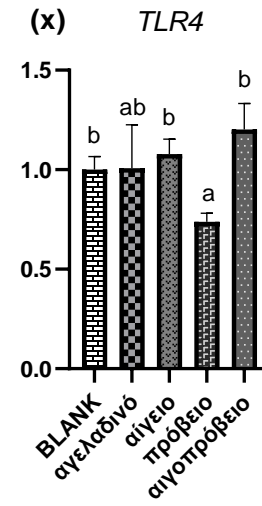
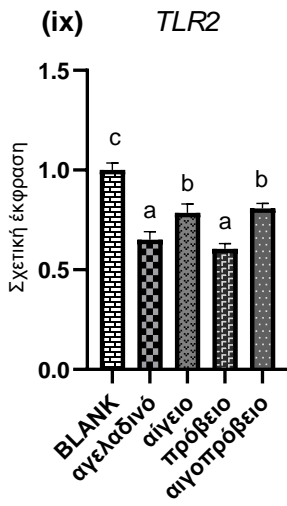
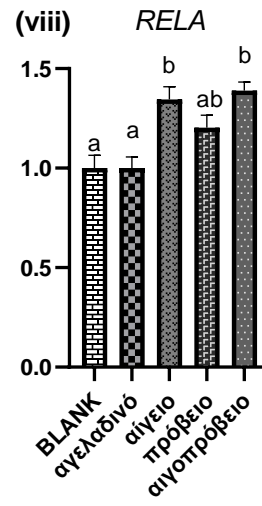
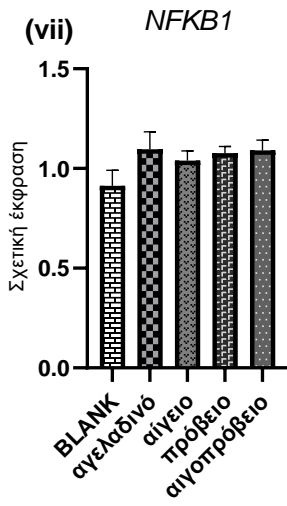
Στα διαγράμματα 4.1, 4.2 και 4.3 αποτυπώνεται η σχετική έκφραση γονιδίων σε THP-1 μακροφάγα ύστερα από την έκθεση τους σε SW-D-P3 συγκριτικά με το BL-D-P3 ως προς τη ζωική προέλευση, τη γεωγραφική προέλευση και την εποχικότητα αντίστοιχα.

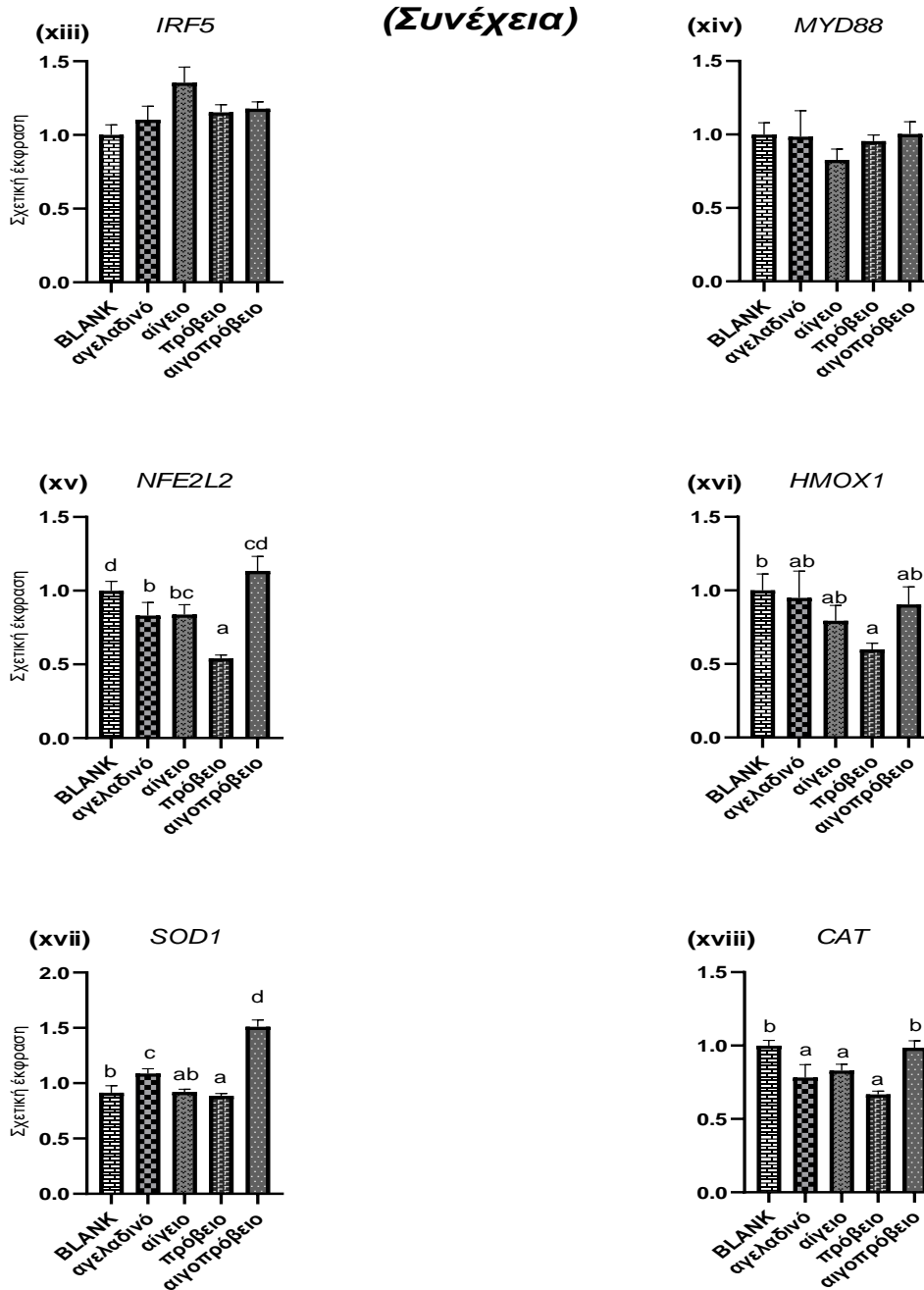
✚ Ως προς τη ζωική προέλευση

Τα δείγματα SW χωρίστηκαν ως προς τη ζωική προέλευση γάλακτος σε 4 ομάδες, οι οποίες αποτελούνταν από το αγελαδινό, αίγιο, πρόβειο και αιγοπρόβειο τυρόγαλα (n=12). Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 4.1 (i), (vi) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) της γονιδιακής έκφρασης των *IL1B* και *ICAM1* σε κύτταρα που εκτέθηκαν τόσο σε πρόβειο όσο και αιγοπρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3, ενώ στα διαγράμματα (iii) και (x) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση των *IL6* και *TLR4* αντίστοιχως μόνο για το πρόβειο SW-D-P3. Παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής έκφρασης ($p \leq 0.05$) της χημειοκίνης *CXCL8* (διάγραμμα 4.1 (ii)) για αγελαδινό, πρόβειο και αιγοπρόβειο σε σχέση με το BL-D-P3, με τη μεγαλύτερη αύξηση να φαίνεται στο αιγοπρόβειο SW-D-P3. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$) στη γονιδιακή έκφραση των *TGFB1*, *TNF*, *NFKB1*, *IRF5* και *MYD88* δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση SW-D-P3 σε THP-1 μακροφάγα (διάγραμμα (iv), (v), (vii), (xiii) και (xiv) αντίστοιχα). Σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του *RELA* για αίγιο και αιγοπρόβειο SW-D-P3, όχι όμως για το πρόβειο και το αγελαδινό (διάγραμμα 4.1 (viii)). Στο διάγραμμα 4.1 (ix) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης του *TLR2* για όλα SW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3, με ακόμη μεγαλύτερη πτώση να εμφανίζεται στο αγελαδινό και πρόβειο SW-D-P3. Παρατηρήθηκε επίσης ελάττωση της σχετικής έκφρασης του *STAT1* (διάγραμμα 4.1 (xi)) στο αίγιο SW-D-P3 σε σύγκριση με BL-D-P3, ενώ τα μακροφάγα που επωάστηκαν με αγελαδινό SW-D-P3 έδειξαν ακόμη μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης του *STAT1*. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA του *STAT2*, *NFE2L2*, *HMOX*, *SOD1* και *CAT* ($p \leq 0.05$) στα THP-1 κύτταρα που εκτέθηκαν στο πρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με τα BL-D-P3 (διάγραμμα 4.1 (xii), (xv), (xvi), (xvii) και (xviii) αντίστοιχα). Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA του *SOD1* παρουσιάστηκαν αυξημένα μετά από έκθεση σε αγελαδινό και αιγοπρόβειο SW-D-P3 στα μακροφάγα, τόσο σε σύγκριση με τα το αίγιο και πρόβειο SW-D-3 όσο και με το BL-D-P3. Στο διάγραμμα 4.1 (ii), εντοπίστηκε σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$) ανάμεσα σε αίγιο και αιγοπρόβειο SW-D-P3, με το πρόβειο να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές mRNA του *CXCL8* συνολικά.



(Συνέχεια)





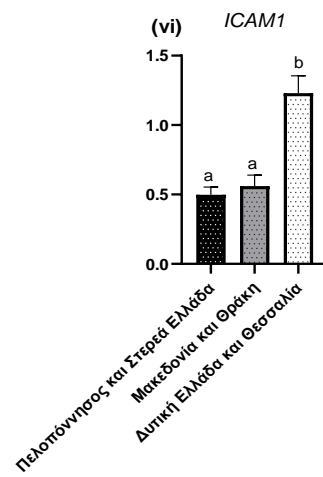
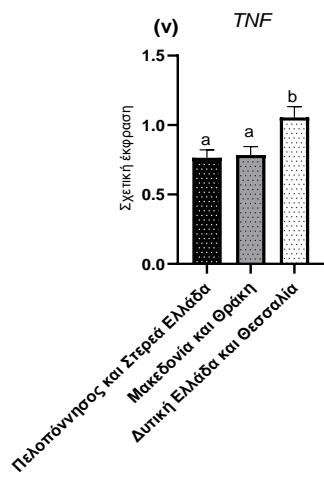
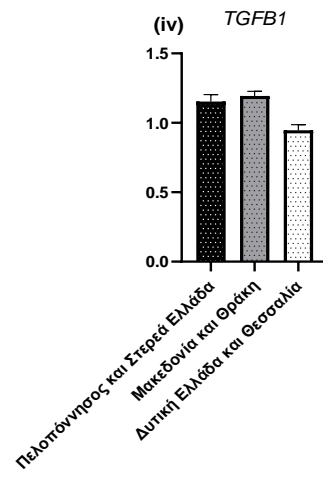
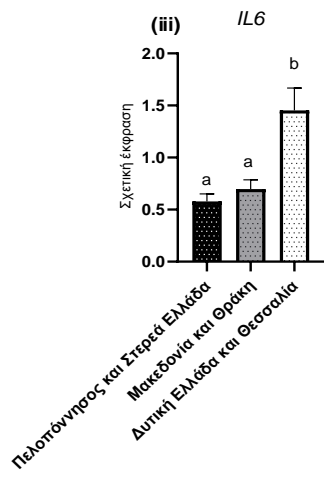
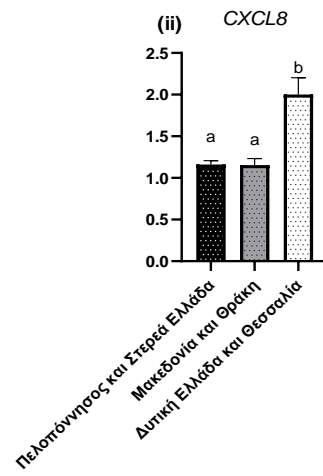
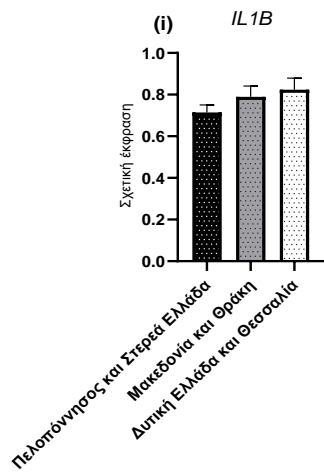
Διάγραμμα 4.1 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFβ1* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKβ1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

📌 Ως προς τη γεωγραφική προέλευση

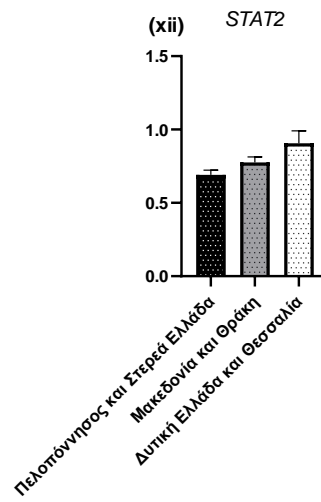
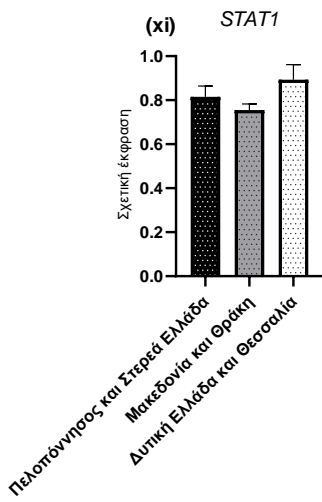
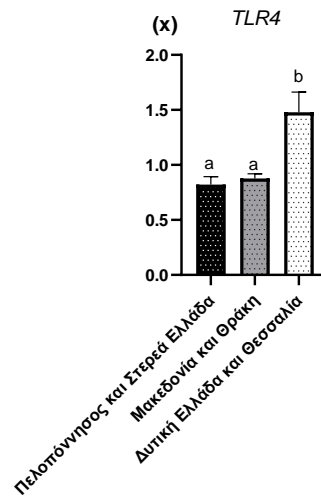
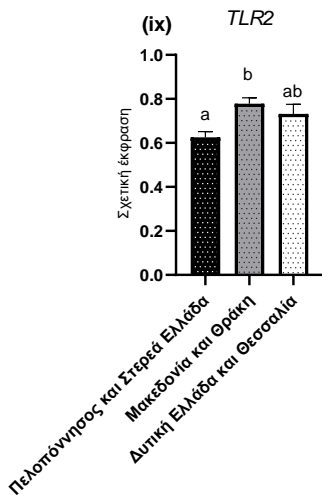
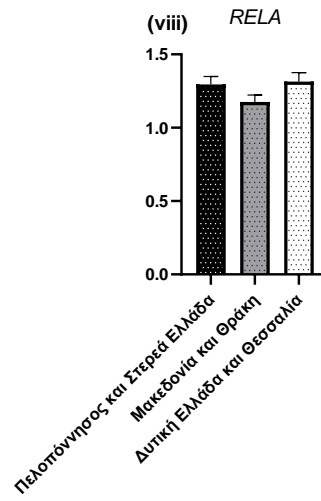
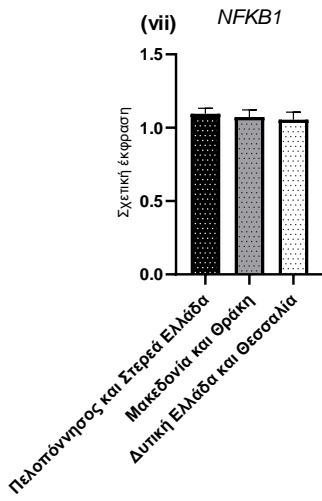
Τα δείγματα SW χωρίστηκαν ως προς τη γεωγραφική προέλευση συλλογής τυρογάλακτος σε 3 περιφέρειες, οι οποίες είναι οι εξής Πελοπόννησος και Στερεά (n=16), Μακεδονία και Θράκη (n=18) και Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία (n=16). Συνολικά, παρατηρήθηκε να υπάρχει επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων του SW στη σχετική έκφραση γονιδίων χρησιμοποιώντας το *in vitro* κυτταρικό μοντέλο THP-1 μακροφάγων, ως αποτυπώνονται στο διάγραμμα 4.2.

Στο διάγραμμα 4.2 (ii), (iii), (v), (vi), (x), (xiv) και (xvi), παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις ($p \leq 0,05$) όσον αφορά τη σχετική έκφραση των *CXCL8*, *IL6*, *TNF*, *ICAM1*, *TLR4*, *MYD88*, *HMOX1* αντίστοιχα των κυττάρων που εκτέθηκαν για 24 ώρες με SW-D-P3 προερχόμενα από την περιφέρεια της Δυτικής Ελλάδας και Θεσσαλίας. Αντιθέτως, για τα δείγματα SW-D-P3 που συλλέχθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη και επώαστηκαν με τα THP-1 μακροφάγα, έδειξαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA ($p \leq 0,05$) για τα γονίδια *SOD1* και *TLR2* (διάγραμμα 4.2 (ix) και (xvii)). Ωστόσο, η σχετική έκφραση του *IRF5* ήταν μικρότερη για τα δείγματα από τη Μακεδονία και Θράκη που εκτέθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική σειρά THP-1 σε σχέση με τις άλλες δύο υπό μελέτη ομάδες (διάγραμμα 4.2 (xiii)). Επίσης, μειωμένη έκφραση ($p \leq 0,05$) των *TLR2* και *NFE2L2* παρατηρήθηκε για τα SW-D-P3 που προέρχονταν από την Πελοπόννησο και Στερεά Ελλάδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιφέρειες (διάγραμμα 4.2 (ix) και (xv)).

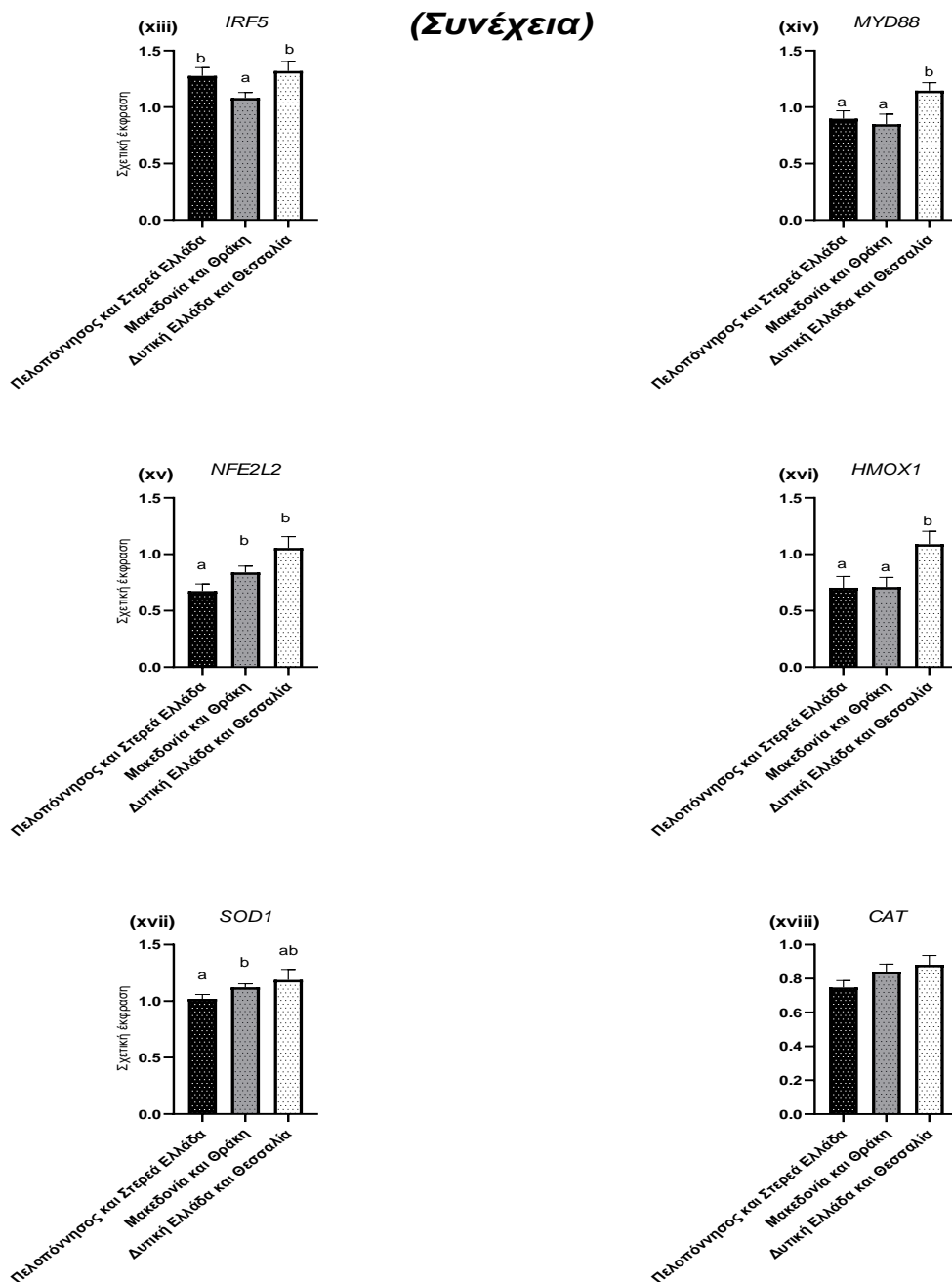
Τέλος, δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) της γονιδιακής έκφρασης των *IL1B*, *TGFB1*, *NFKB1*, *RELA*, *STAT1*, *STAT2* και *CAT* σε THP-1 κύτταρα που εκτέθηκαν σε AW-D-P3 συγκρίνοντας τις τρεις περιφέρειες. (διάγραμμα 4.2 (i), (iv), (vii), (viii), (xi), (xii) και (xviii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



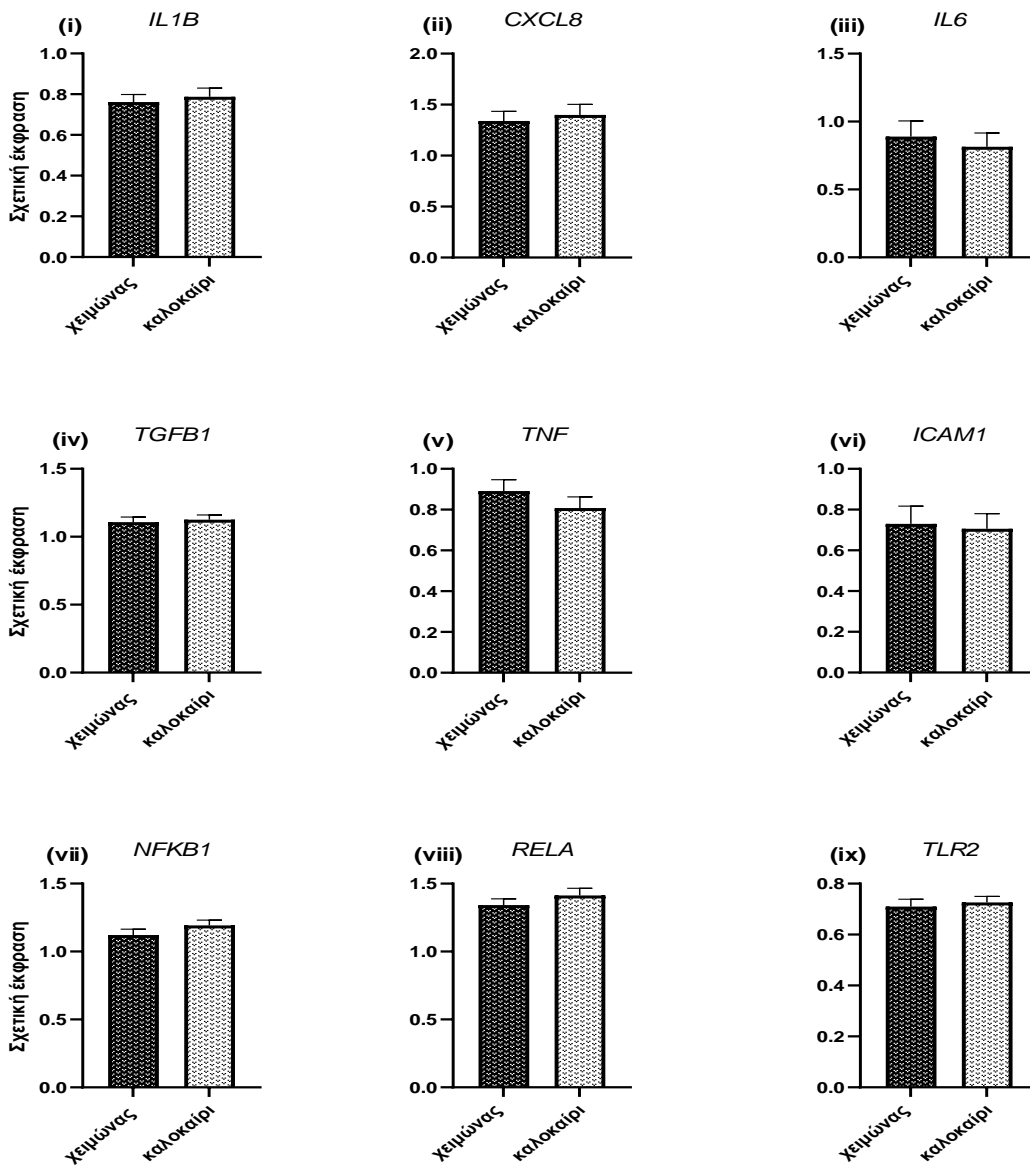
(Συνέχεια)



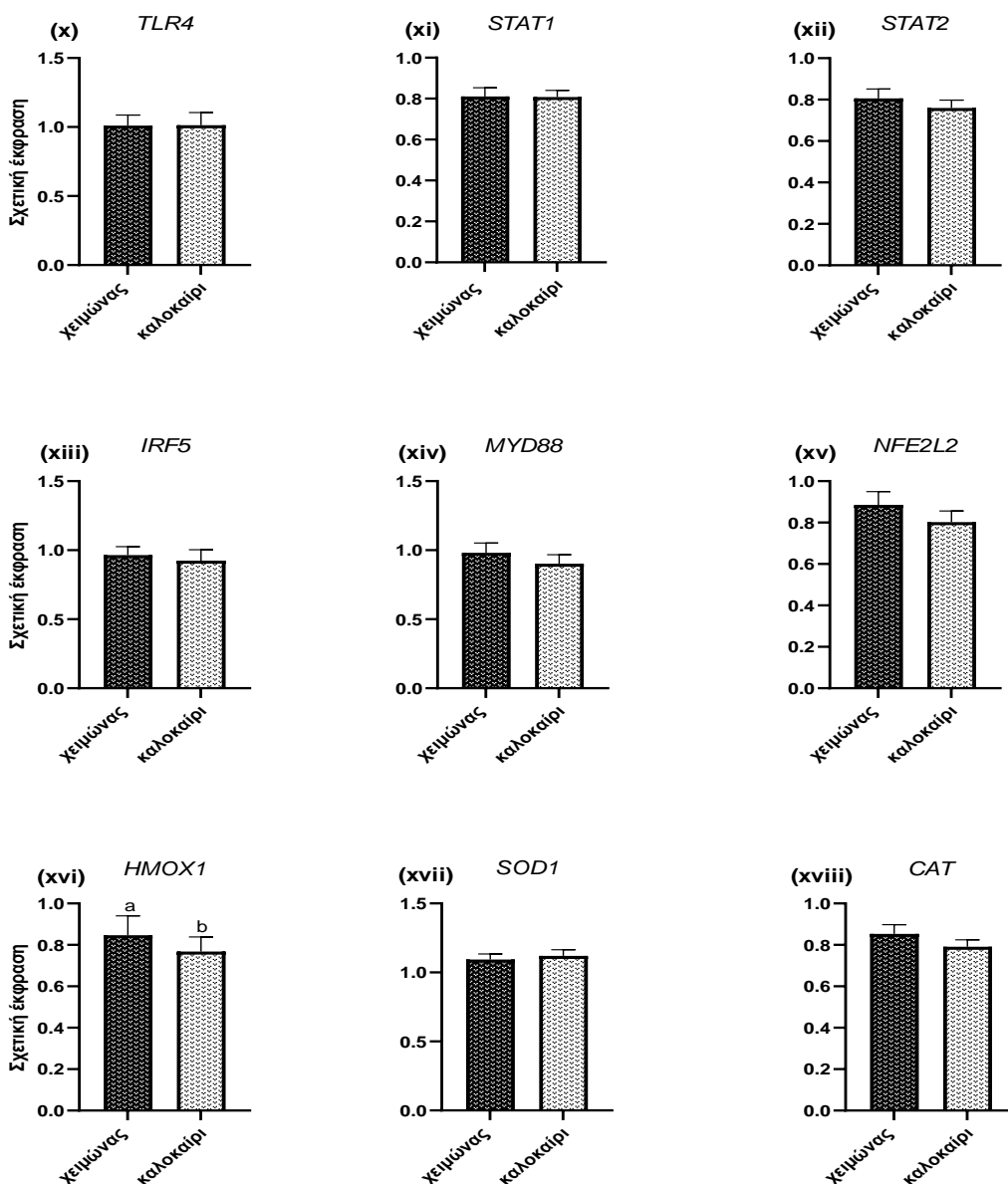
Διάγραμμα 4.2 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFB1* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

✚ Ως προς την εποχικότητα

Τα SW χωρίστηκαν σε δύο ομάδες όσον αφορά τον παράγοντα μελέτης της εποχικότητας, με τα καλοκαιρινά SW να απαρτίζονται από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από 1^η Μαΐου-30^η Οκτώβρη (n=24) ενώ τα χειμερινά συλλέχθηκαν από 1^η Νοέμβρη-30^η Απρίλη (n=24). Αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.3 (i)-(xviii), χωρίς ωστόσο, να παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές αλλαγές ($p \geq 0,05$) για τα 17 από αυτά. Μόνο τα επίπεδα mRNA του *HMOX1* διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p \leq 0,05$) μεταξύ καλοκαιρινών και χειμερινών SW-D-P3, με αυτά που συλλέχθηκαν το χειμώνα να φέρουν αυξημένα επίπεδα (διάγραμμα 4.3 (xvi)).



(Συνέχεια)



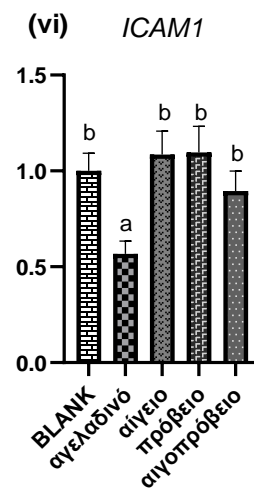
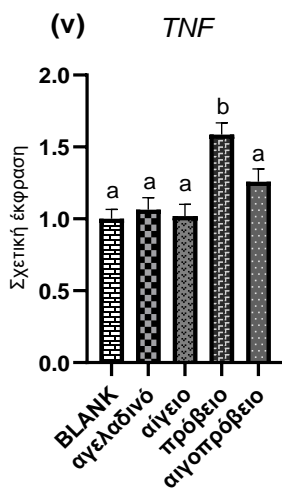
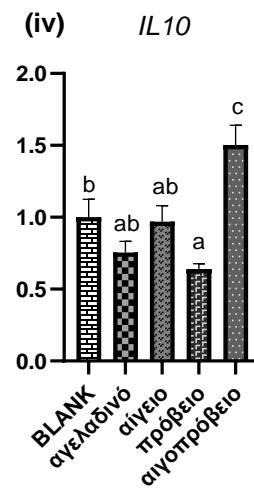
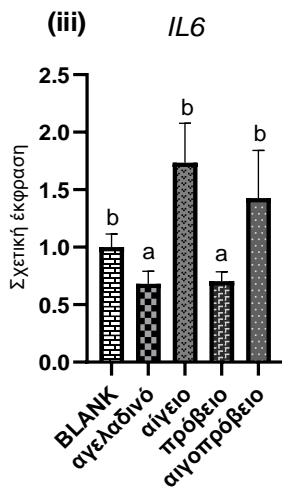
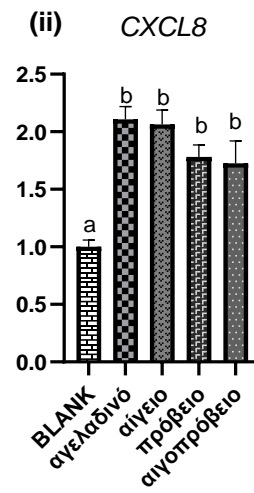
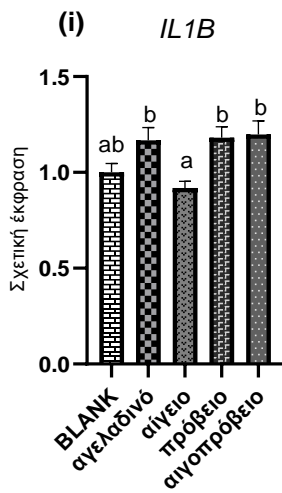
Διάγραμμα 4.3 Επίδραση της επικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFBI* (v) *TNF*, (vi) *ICAMI*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.1.1.2 Γονιδιακή έκφραση σε ενεργοποιημένα THP-1 μακροφάγα

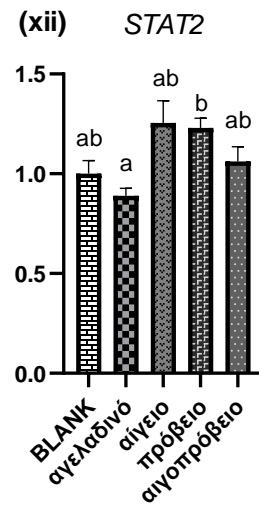
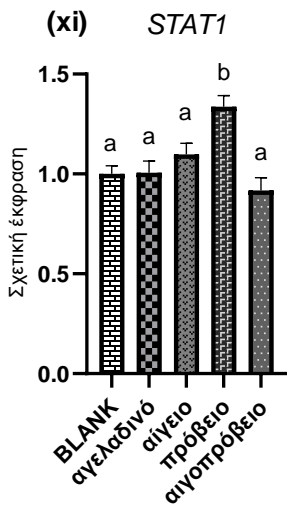
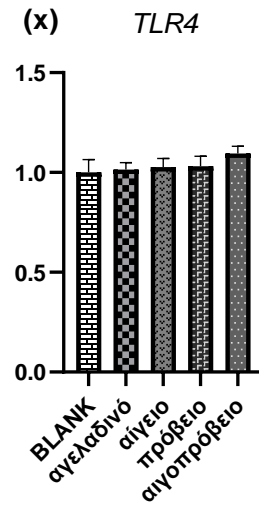
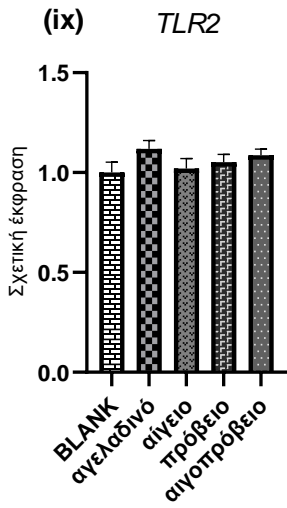
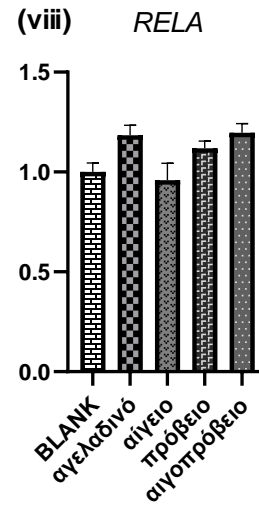
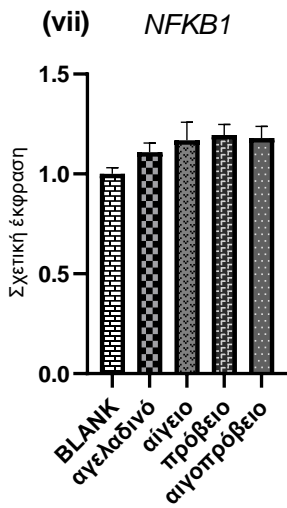
✚ Ως προς τη ζωική προέλευση

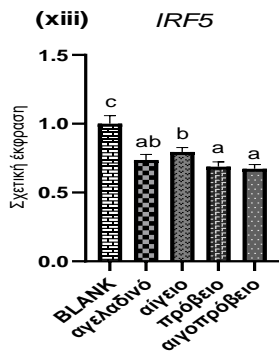
Στο διάγραμμα 4.4 παρουσιάζεται η σχετική έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση, σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα ύστερα από ταυτόχρονη επώαση των SW-D-P3 με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Ύστερα, συγκρίθηκαν τόσο με το BL-D-P3 όσο και μεταξύ τους τα SW-D-P3, λαμβάνοντας υπόψιν τη διαφορετική ζωική προέλευση του γάλακτος (αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο και αιγοπρόβειο).

Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA των *CXCL8* και *CAT* εμφανίστηκαν αυξημένα ($p \leq 0,05$) ανεξάρτητα από τη προέλευση του SW σε σχέση με αυτά των BL-D-P3 μετά την 24-ωρη έκθεσή τους στα ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.4 (ii) και (xviii)), ενώ τα επίπεδα *TNF* και *STAT1* ήταν στατιστικώς υψηλά μόνο για το πρόβειο SW-D-P3 (διάγραμμα 4.4 (v) και (xi)). Επίσης, στο διάγραμμα 4.4 (vi), (xii), (xiv) και (xvi) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση ($p \leq 0,05$) της γονιδιακής έκφρασης των *ICAM1*, *STAT2*, *MYD88* και *HMOX1* σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε αγελαδινό SW-D-P3, και αντίστοιχα της *IL10* σε πρόβειο SW-D-P3 και της *IL1B* σε αίγαιο SW-D-P3 (διάγραμμα 4.4 (iv) και (i)). Αντιθέτως, σημειώθηκε σημαντική ελάττωση ($p \leq 0,05$) της σχετικής έκφρασης του *IRF5* (διάγραμμα 4.4 (xiii)) ύστερα από την έκθεση του SW-D-P3 στα THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα σε σύγκριση με τα BL-D-P3, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης, ενώ τα επίπεδα έκφρασης mRNA για το *IL6* ήταν μειωμένα μόνο κατά την έκθεση αγελαδινού και πρόβειου SW-D-P3 (διάγραμμα 4.4 (iii)). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα mRNA των *IL10* και *SOD1* καταγράφηκαν ως τα πιο υψηλά ($p \leq 0,05$) μετά την έκθεσή σε αιγοπρόβειο SW-D-P3 στα THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.4 (iv) και (xvii)). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) στη σχετική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *NFKB1* και *RELA*, των υποδοχέων *TLR2* και *TLR4* και του αντιοξειδωτικού γονιδίου *NFE2L2* δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση SW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.4 (vii), (viii), (ix), (x) και (xv) αντίστοιχα).

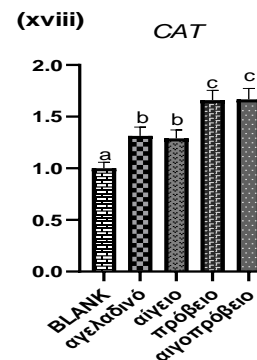
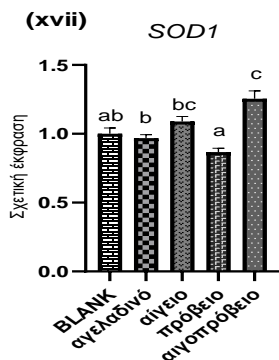
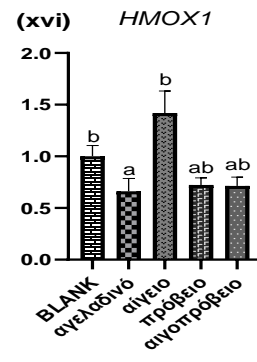
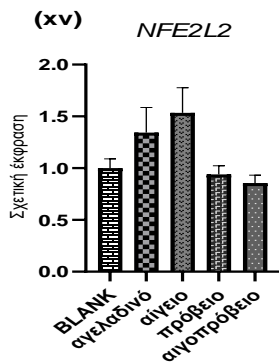
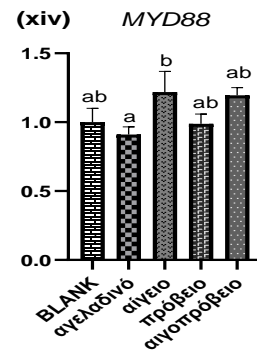


(Συνέχεια)





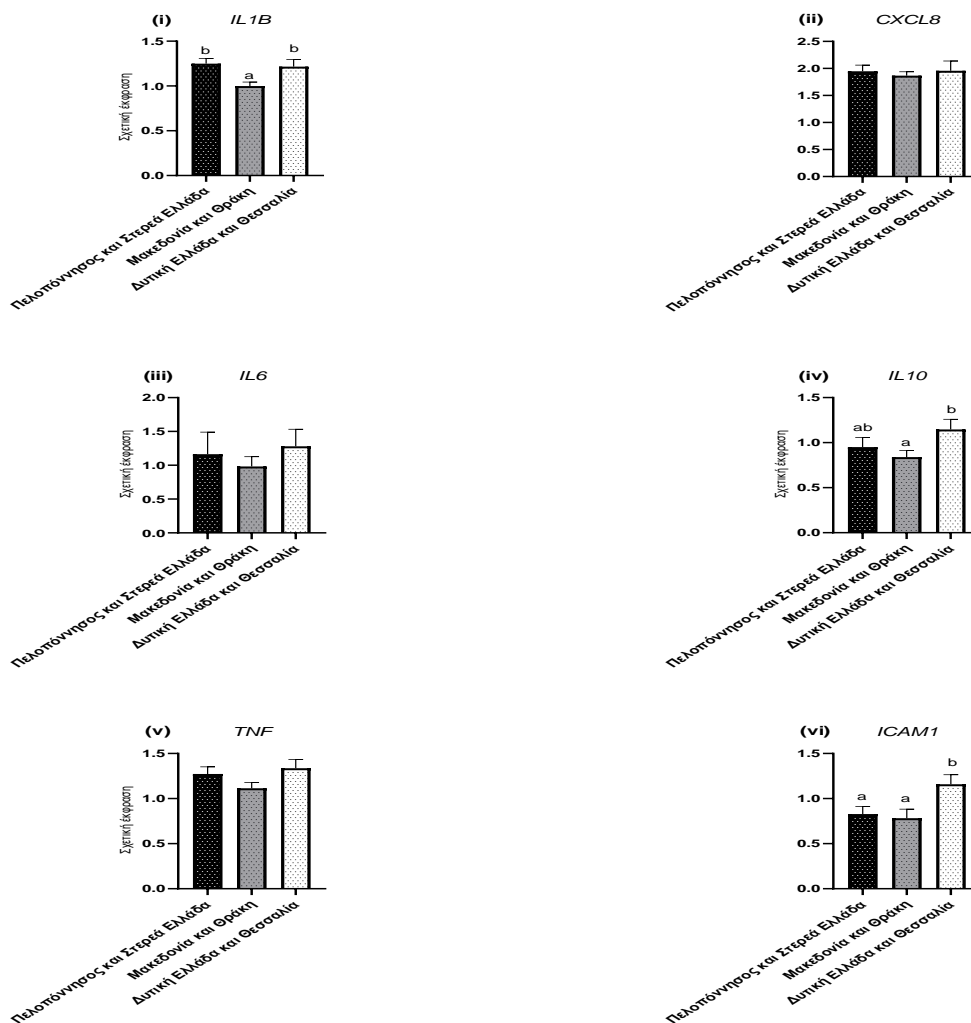
(Συνέχεια)



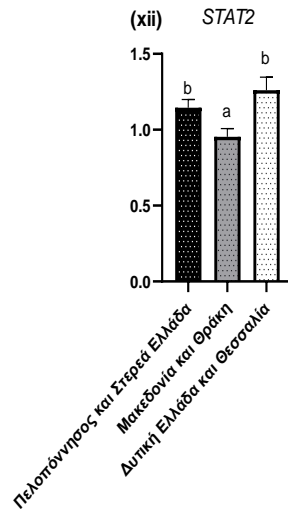
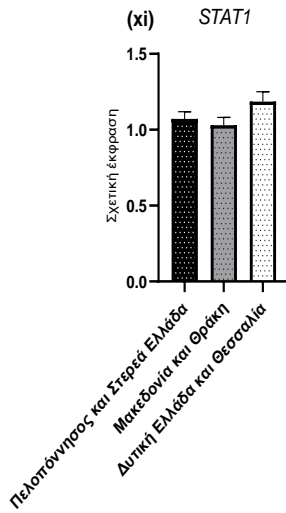
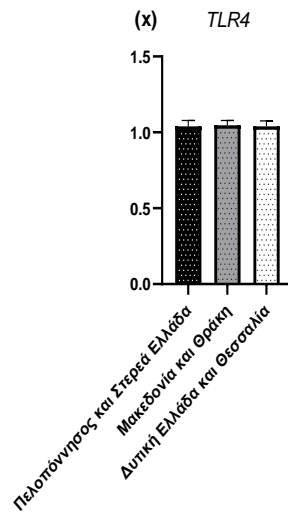
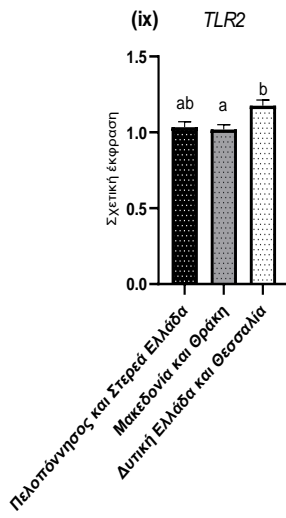
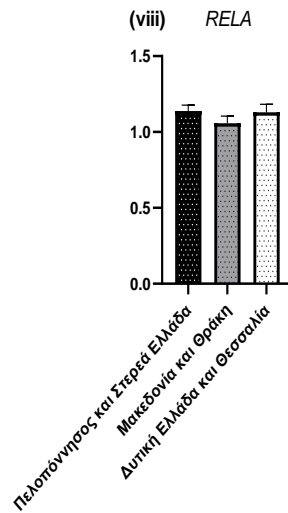
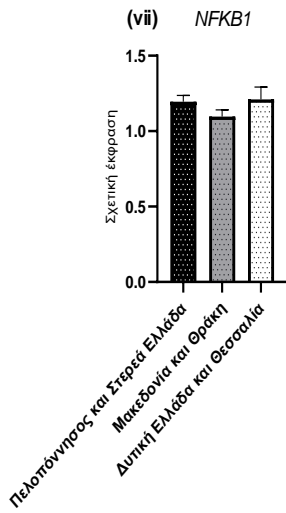
Διάγραμμα 4.4 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

🌍 Ως προς τη γεωγραφική προέλευση

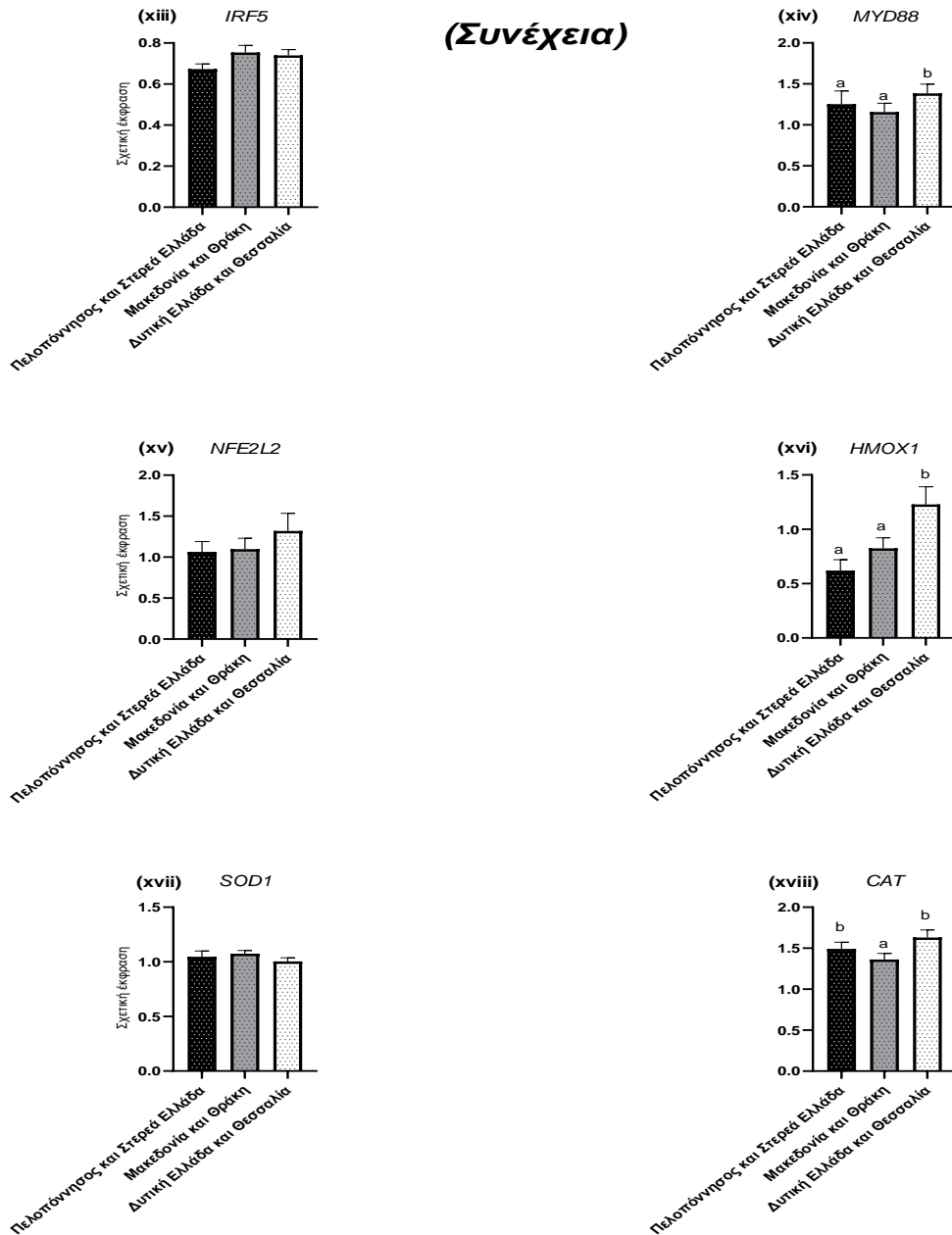
Στο διάγραμμα 4.5 παρουσιάζεται η επίδραση των SW-D-P3 διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης σε LPS διεγερμένα THP-1 μακροφάγα, όπου λογίζεται ως ένα *in vitro* μοντέλο ήπιας φλεγμονώδους αντίδρασης. Η σχετική γονιδιακή έκφραση των *IL1B*, *IL10*, *TLR2*, *STAT2* και *CAT* ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη ($p \leq 0,05$) σε κύτταρα που εκτέθηκαν SW-D-P3, προερχόμενα από SW που συγκεντρώθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη (διάγραμμα 4.5 (i), (iv), (ix), (xii) και (xviii) αντίστοιχα). Επίσης, παρατηρήθηκε πως για τα *ICAM1*, *MYD88* και *HMOX1* καταγράφηκαν οι υψηλότερες τιμές ($p \leq 0,05$) σε THP-1 μακροφάγα που εκτέθηκαν με SW-D-P3 από τη Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία (διάγραμμα 4.5 (vi), (xiv) και (xvi) αντίστοιχα). Τέλος, καμία διαφορά ($p \geq 0,05$) δε σημειώθηκε στην έκφραση των γονιδίων *CXCL8*, *IL6*, *TNF*, *NFKB1*, *RELA*, *TLR4*, *STAT1*, *IRF5*, *NFE2L2* και *SOD1* (διάγραμμα 4.5 (ii), (iii), (v), (vii), (viii), (x), (xi), (xiii), (xv) και (xvii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



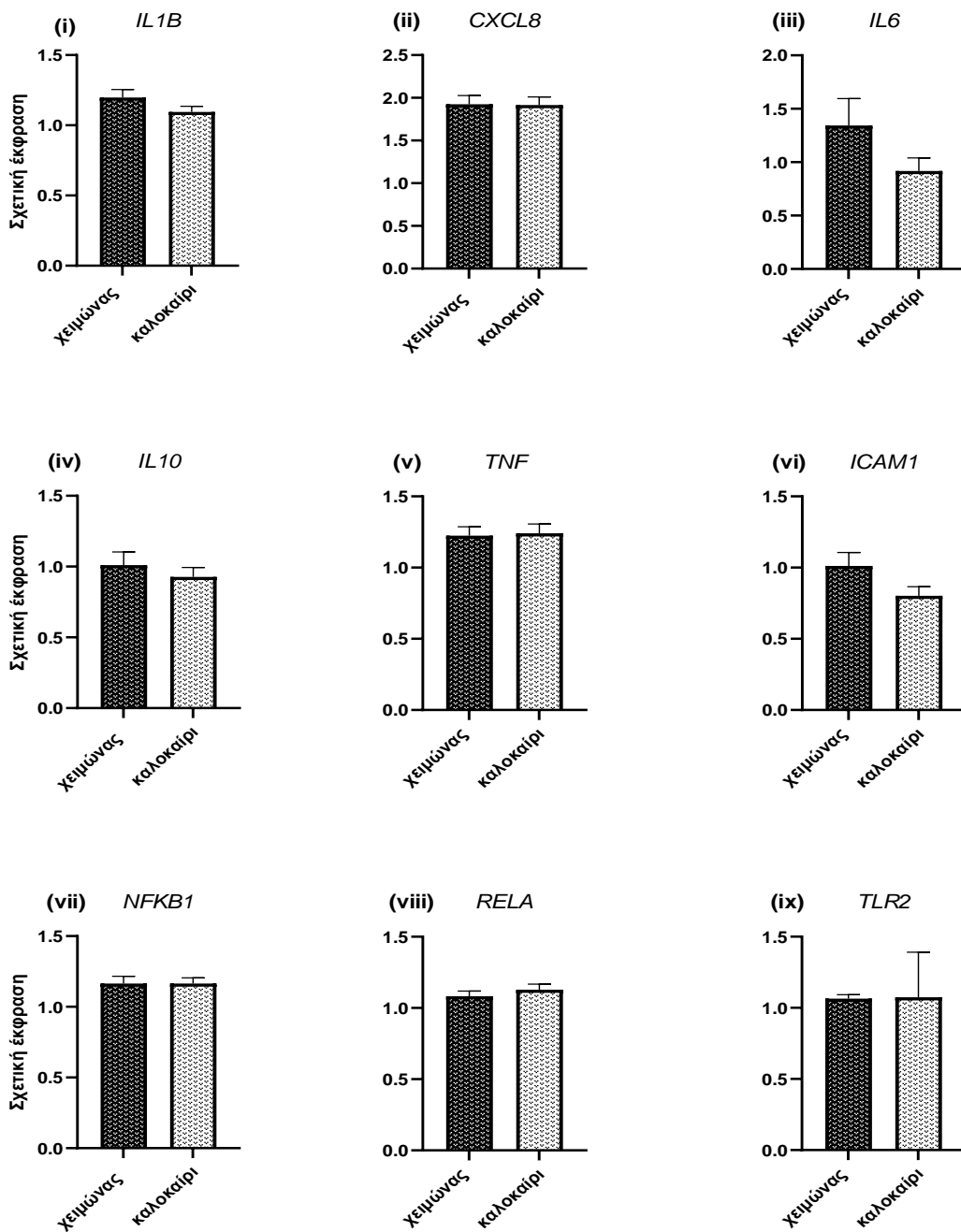
(Συνέχεια)



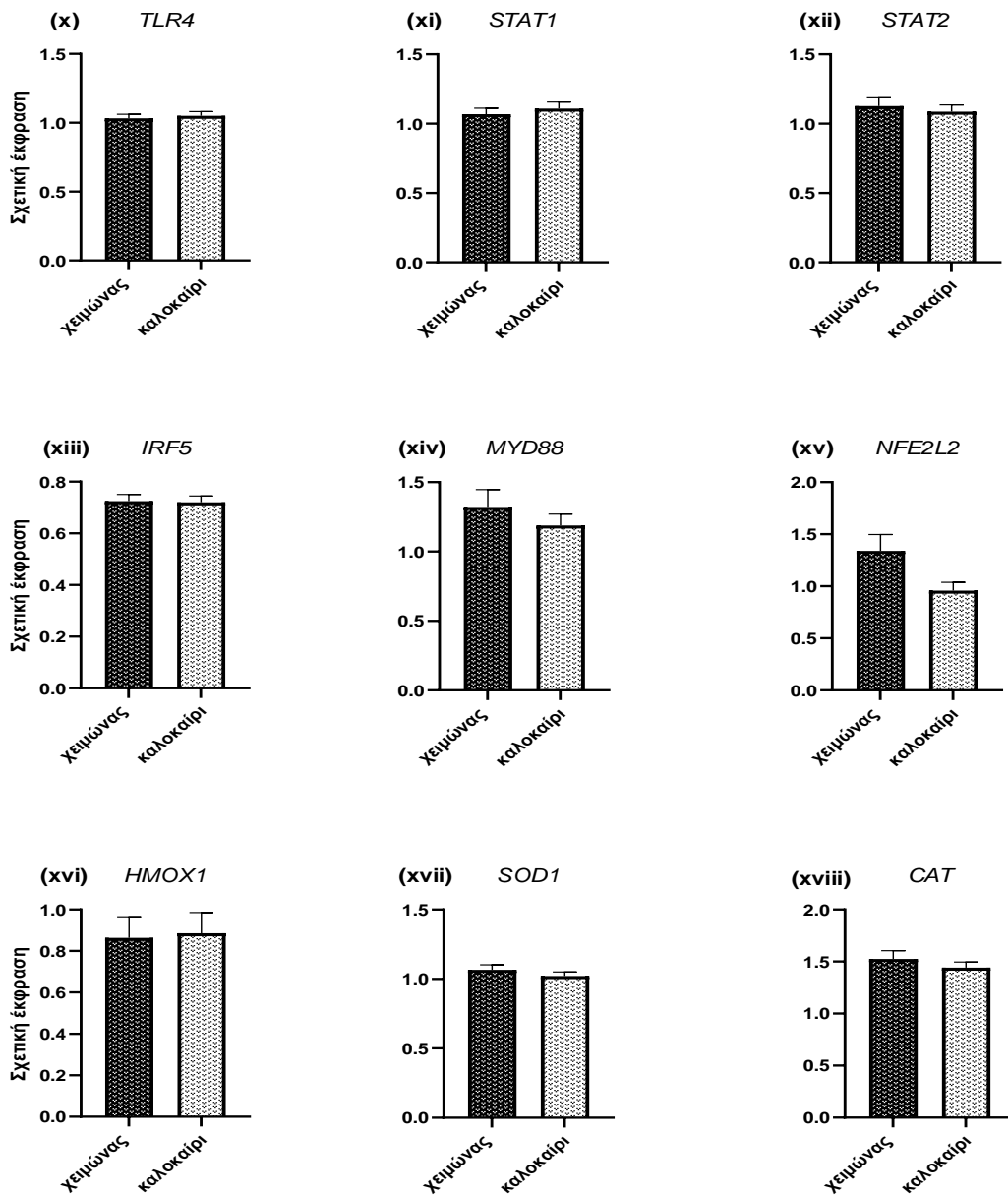
Διάγραμμα 4.5 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Ως προς την εποχικότητα

Στο διάγραμμα 4.6 αποτυπώνεται η σχετική γονιδιακή έκφραση, των *IL1B*, *CXCL8*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *ICAM1*, *NFKB1*, *RELA*, *TLR2*, *TLR4*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF5*, *MYD88*, *NFE2L2*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT* έπειτα από την έκθεση του SW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα για 24 ώρες, χωρίς ωστόσο, να παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικές αλλαγές ($p \geq 0,05$) για κανένα από αυτά τα γονίδια ανάμεσα σε καλοκαιρινά και χειμερινά SW-D-P3.



(Συνέχεια)



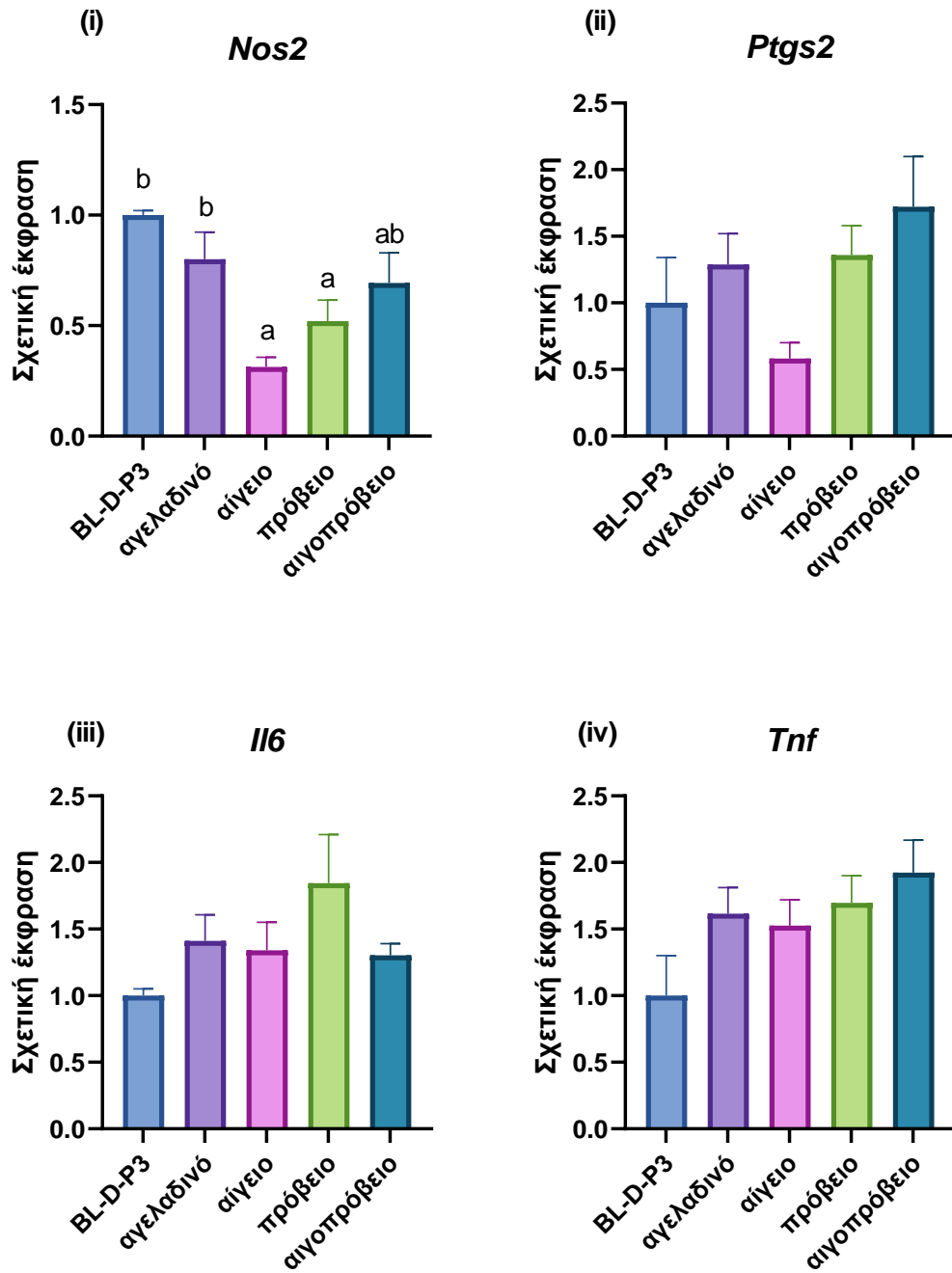
Διάγραμμα 4.6 Επίδραση της εποχικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10*, (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

4.1.1.3 Γονιδιακή έκφραση σε ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα

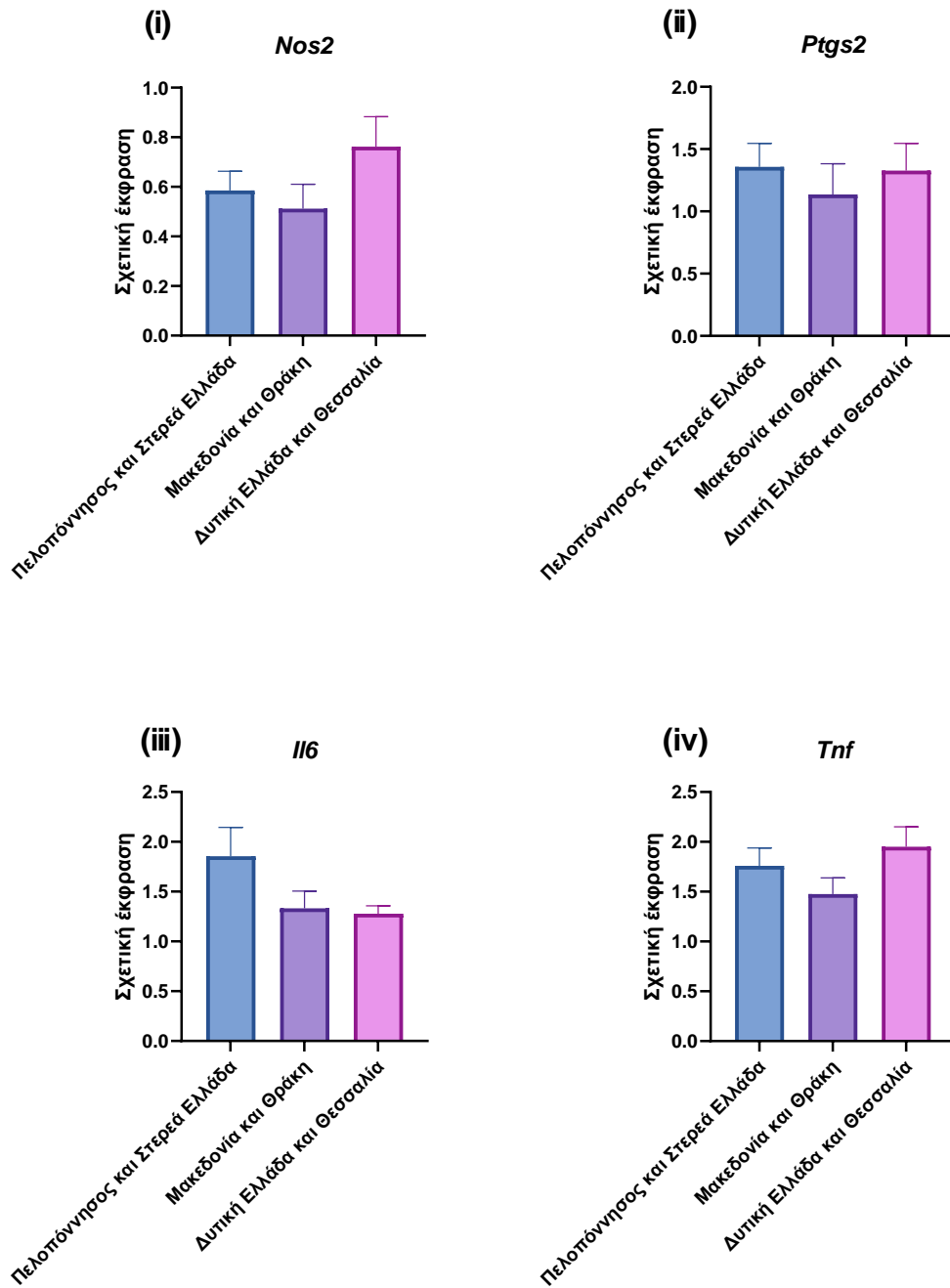
Εξετάστηκαν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων *Nos2* και *Ptgs2*, της ιντρελευκίνης *Il6* και του παράγοντα *Tnf* σε ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα. Η επίδραση του τυρογάλακτος αξιολογήθηκε έπειτα από 24 ώρες ταυτόχρονης έκθεσης LPS (συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/ml}$) και SW-D-P3 (συγκέντρωσης 3 mg πρωτεΐνης/mL) ή BL-D-P3 (τυφλό; πέψη χωρίς τρόφιμο) με qPCR, τόσο ως προς τη ζωική και γεωγραφική προέλευση όσο και ως προς τον παράγοντα της εποχικότητας.

Πιο συγκεκριμένα στο διάγραμμα 4.7 (i), παρατηρείται πως η σχετική έκφραση του *Nos2* για το αίγαιο και πρόβειο SW-D-P3 είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$) με το BL-D-P3, με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης να σημειώνονται για τα SW προερχόμενα από αίγαιο και πρόβειο γάλα. Αντιθέτως, η σχετική έκφραση του *Nos2* για το αγελαδινό SW-D-P3 δεν παρουσίασε διαφορά με το BL-D-P3, ενώ υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά με το αίγαιο και πρόβειο SW-D-P3. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($p \geq 0,05$) στη σχετική έκφραση του ενζύμου *Ptgs2* και των κυτοκινών *Il6* και *Tnf* συγκρίνοντας τα διαφορετικά είδη SW-D-3 μεταξύ τους ούτε με το BL-D-P3 (στο διάγραμμα 4.7 (ii), (iii), (iv)).

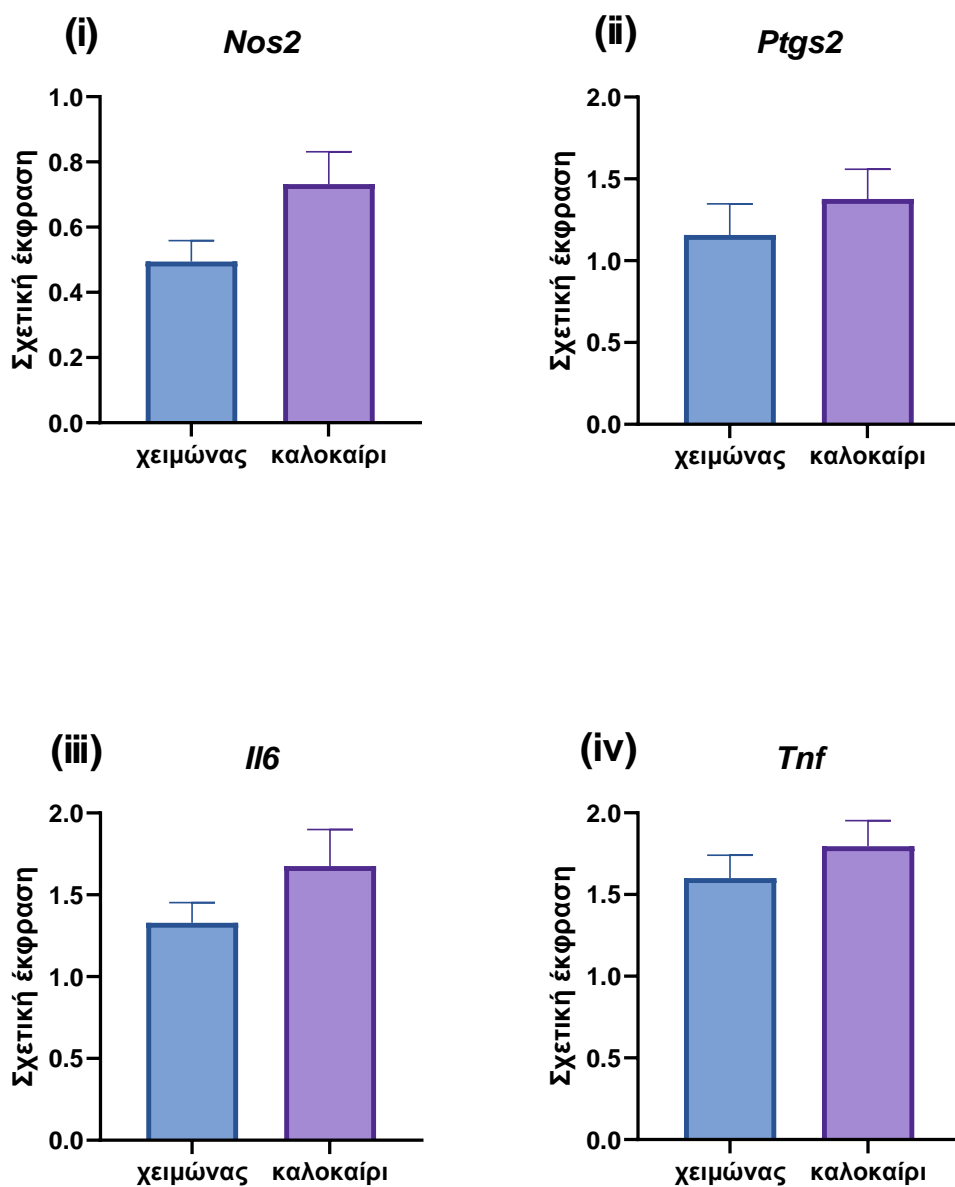
Η διαφορετική γεωγραφική προέλευση καθώς και η εποχικότητα των δειγμάτων SW δεν είχαν κάποια επίδραση στα RAW 264.7 ενεργοποιημένα μακροφάγα. Δηλαδή, δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στα επίπεδα mRNA των γονιδίων *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* και *Tnf* ανάμεσα στις τρεις υπό μελέτη περιφέρειες (στο διάγραμμα 4.8). καθώς και στις 2 υπό μελέτη εποχές (στο διάγραμμα 4.9).



Διάγραμμα 4.7 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cyc1* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.8 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cycl* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM.

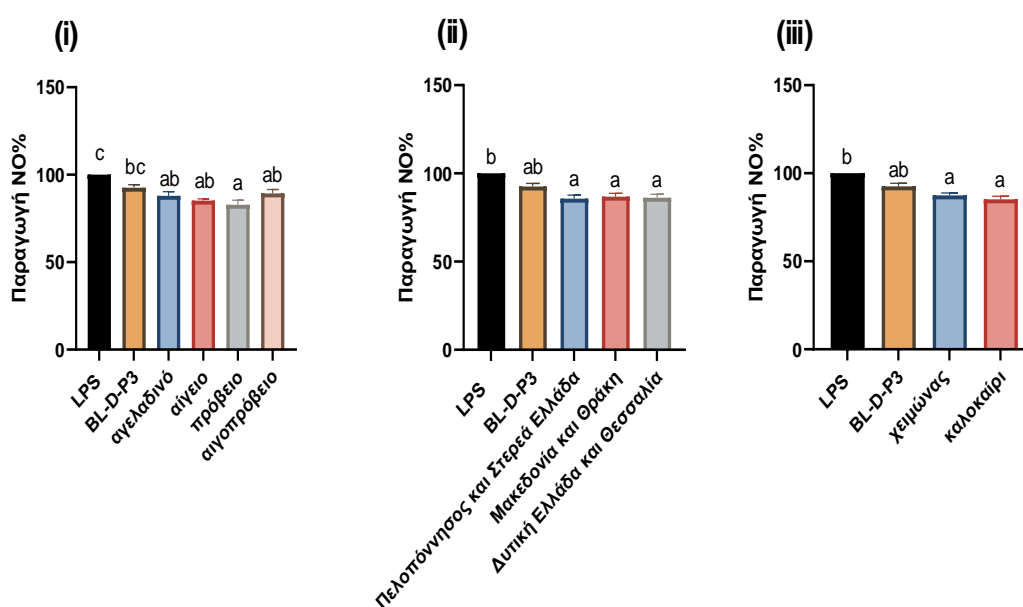


Διάγραμμα 4.9 Επίδραση της εποχικότητας του SW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cyc1* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM.

4.1.1.4 Αναστολή παραγωγής νιτρικού οξέος

Για τον προσδιορισμό του αντιφλεγμονώδους δυναμικού του SW-D-P3, αξιολογήθηκε η ικανότητα του SW-D-P3 να αναστέλλει την παραγωγή του νιτρικού οξέος % σε διεγερμένα με LPS, μακροφάγα RAW 264.7 με τη μέθοδο Griess. Η μέθοδος Griess

είναι μία έμμεση μέθοδος ποσοτικοποίησης του NO και χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του NO που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο της RAW 264.7 καλλιέργειας. Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.10 (i), το κλάσμα SW-D-P3 κατέστειλε την παραγωγή του NO σε σχέση με την LPS ομάδα (κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε LPS), ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης. Στο ίδιο διάγραμμα παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση ($p \leq 0,05$) της παραγωγής του NO% για το πρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3. Επίσης, στο διάγραμμα 4.10 (ii) και (iii), δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) όσον αφορά τη γεωγραφική προέλευση και την εποχικότητα.



Διάγραμμα 4.10 Επίδραση του SW-D-P3 στην παραγωγή νιτρικού οξέος % σε LPS ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα ως προς: (i) την ζωική προέλευση, (ii) τη γεωγραφική προέλευση και (iii) την εποχικότητα. Η διέγερση των RAW 264.7 κύτταρων (5×10^5 κύτταρα/ml) πραγματοποιήθηκε με 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα % ως προς το LPS (control; κύτταρα μόνο με LPS). Αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.1.2 Αποτελέσματα ανοσορυθμιστικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης

4.1.2.1 Γονιδιακή έκφραση σε μη ενεργοποιημένα THP-1 μακροφάγα

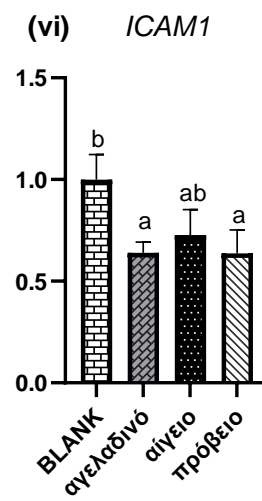
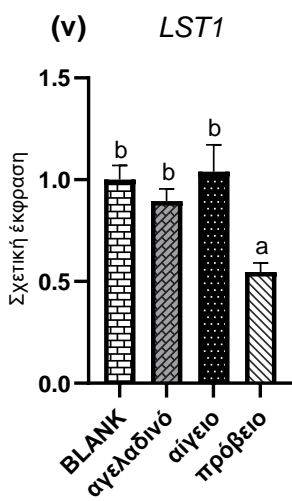
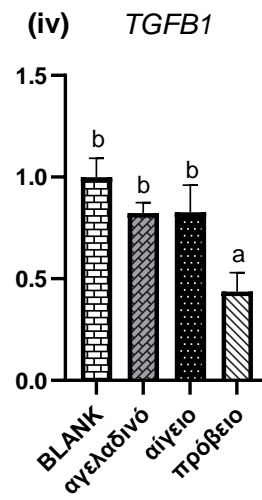
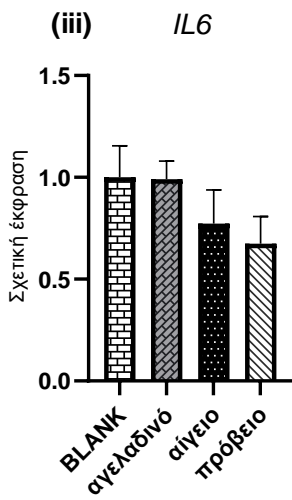
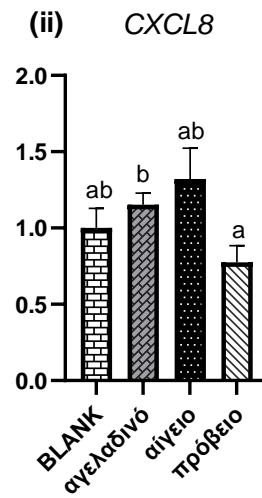
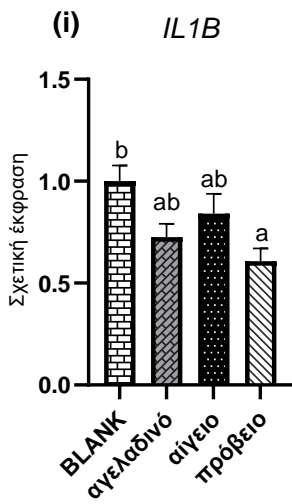
Τα αποτελέσματα της σχετικής γονιδιακής έκφρασης σε THP-1 μακροφάγα ύστερα από την έκθεση τους σε AW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3 ως προς τη ζωική και γεωγραφική προέλευση και την εποχικότητα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 4.11, 4.12, 4.13 αντίστοιχα.

✚ Ως προς τη ζωική προέλευση

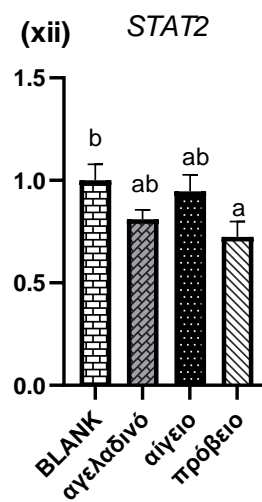
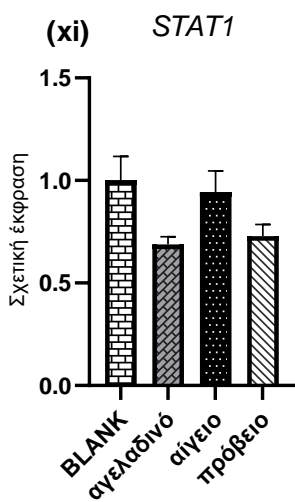
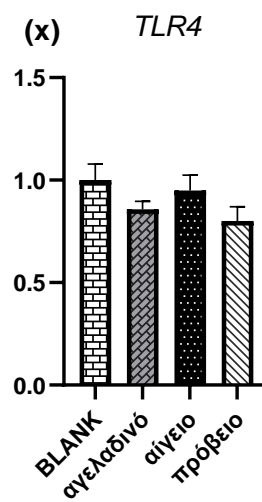
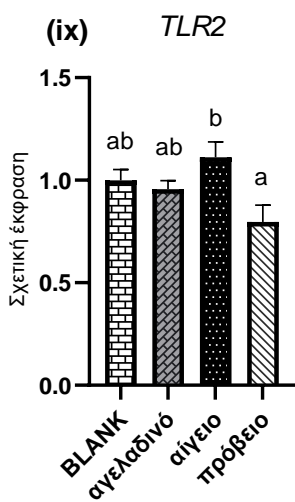
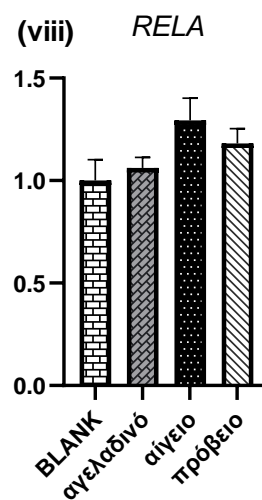
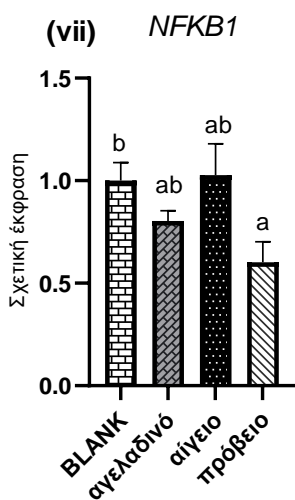
Τα δείγματα AW χωρίστηκαν ως προς τη ζωική προέλευση γάλακτος σε αγελαδινό (n=18), αίγιο (n=8) και πρόβειο (n=7) ΟΟΓ. Στο διάγραμμα 4.11 παρουσιάζεται η σχετική έκφραση γονιδίων, που εμπλέκονται στην ανοσιακή ρύθμιση, σε THP-1 μακροφάγα ύστερα από την έκθεση τους σε AW-D-P3 συγκριτικά με το BL-D-P3 και μεταξύ AW διαφορετικής ζωικής προέλευσης.

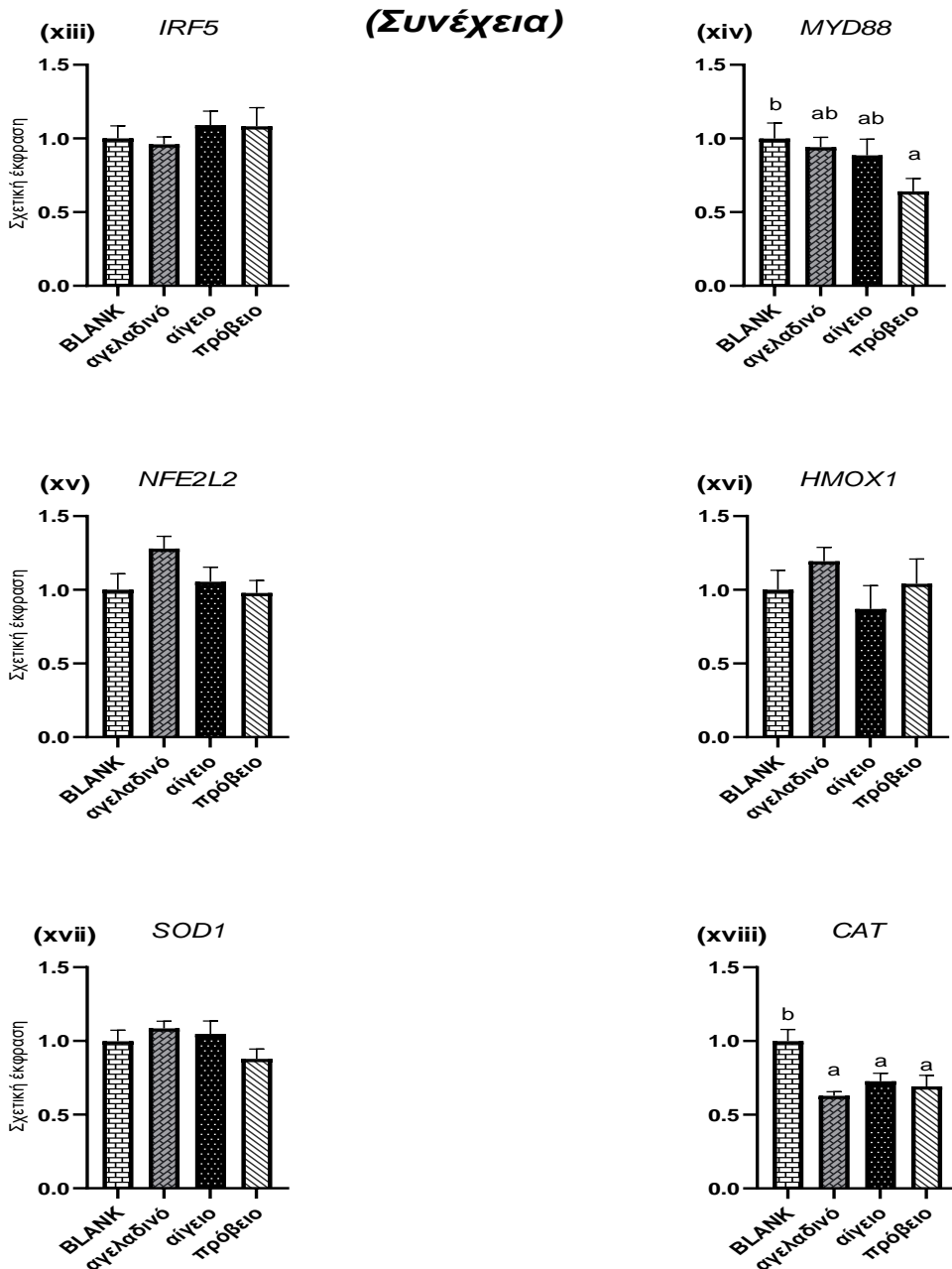
Πιο αναλυτικά, παρουσιάστηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA των *IL1B*, *TGFB*, *LST1*, *NFKB1*, *STAT2* και *MYD88* ($p \leq 0,05$) μόνο στα μακροφάγα που εκτέθηκαν σε πρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με εκείνα που εκτέθηκαν σε BL-D-P3 (διάγραμμα 4.11 (i), (iv), (v), (vii), (xii), και (xiv)). Επίσης, μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA των *CXCL8* και *TLR2* σημειώθηκαν με την έκθεση των κυττάρων σε πρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με εκείνο της έκθεσης του αγελαδινού SW-D-P3 για τη χημειοκίνη (διάγραμμα 4.11 (ii)) καθώς και εκείνο της έκθεσης του αίγιου SW-D-P3 για τον Toll-like υποδοχέα, (διάγραμμα 4.11 (ix)). Παρόμοια αποτελέσματα αποτυπώθηκαν και για τη σχετική έκφραση του *ICAM1* (διάγραμμα 4.11(vi)) κατά την έκθεση SW-D-P3 στην κυτταρική σειρά THP-1, με τα επίπεδα να είναι στατιστικώς χαμηλότερα για το αγελαδινό και το πρόβειο SW-D-P3, σε σχέση με BL-D-P3. Αξίζει να σημειωθεί πως η σχετική έκφραση του αντιοξειδωτικού γονιδίου *CAT* ήταν σημαντικά μειωμένη ($p \leq 0,05$) σε όλα τα SW-D-P3 κατά την έκθεση του σε THP-1 μακροφάγα σε σχέση με το BL-D-P3 (διάγραμμα 4.11 (xviii)), που όμως αυτή η διαφορά εξαλείφεται στα ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.14 (xviii)).

Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) στη γονιδιακή έκφραση των *IL6*, *RELA*, *TLR4*, *STAT1*, *IRF5*, *NFE2L2*, *HMOX1* και *SOD1* δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση AW-D-P3 σε THP-1 μακροφάγα (διάγραμμα 4.11 (iii), (viii), (x), (xi), (xiii), (xv)-(xvii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)

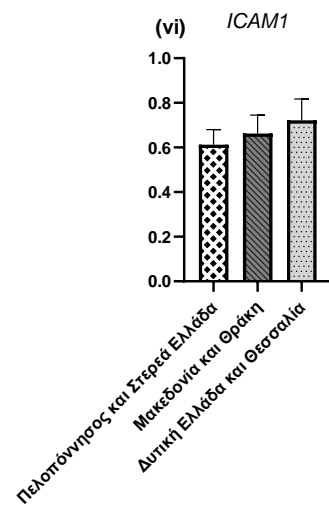
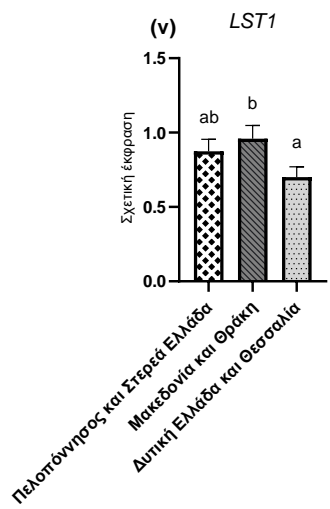
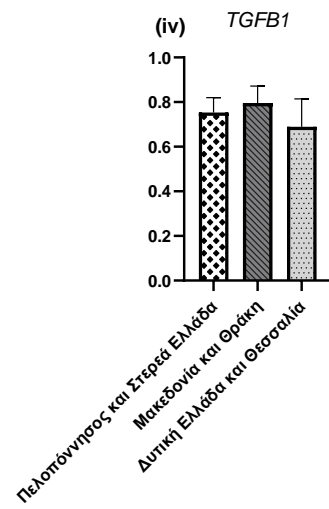
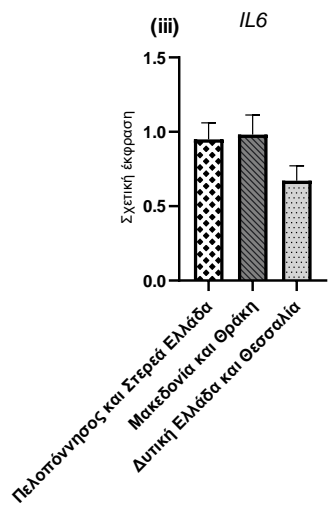
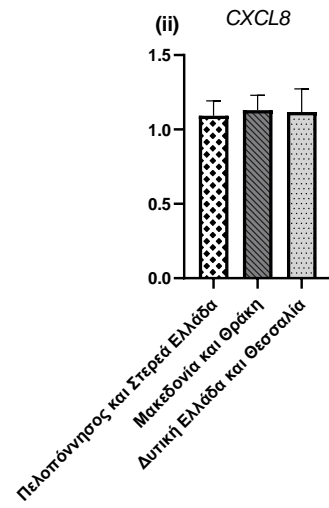
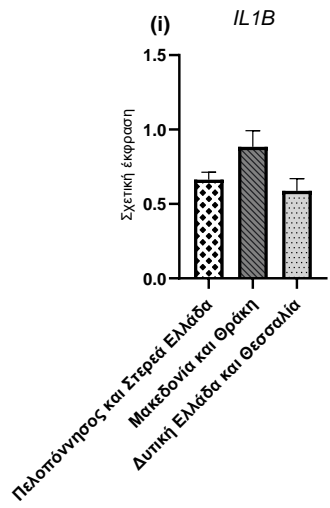




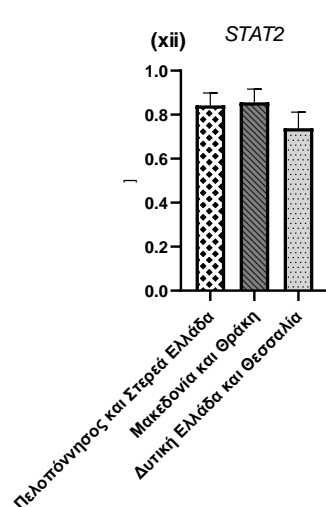
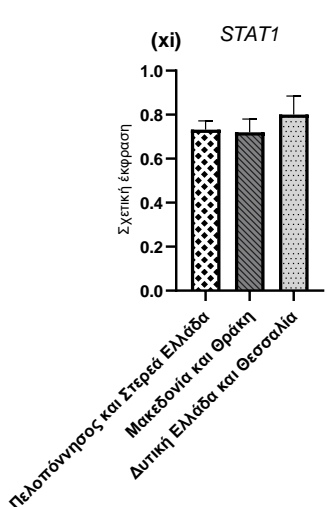
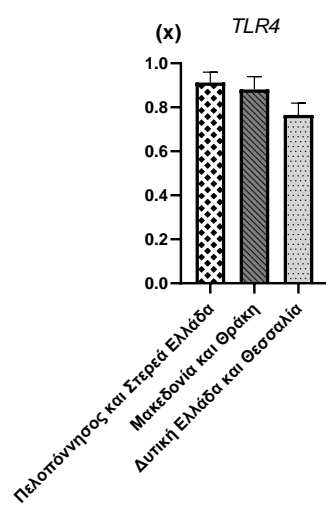
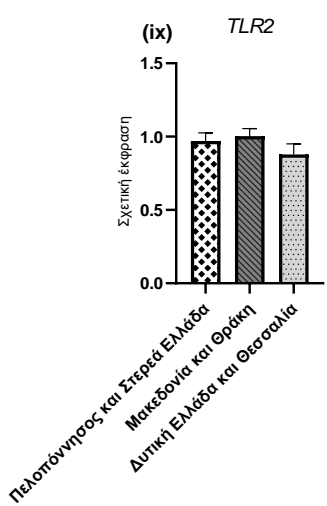
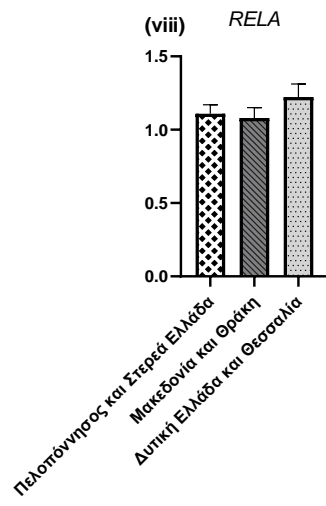
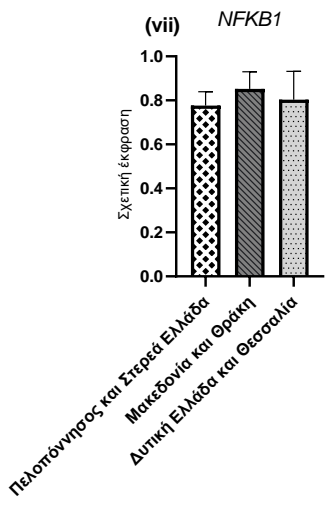
Διάγραμμα 4.11 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFB1* (v) *LST1*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

✚ Ως προς τη γεωγραφική προέλευση

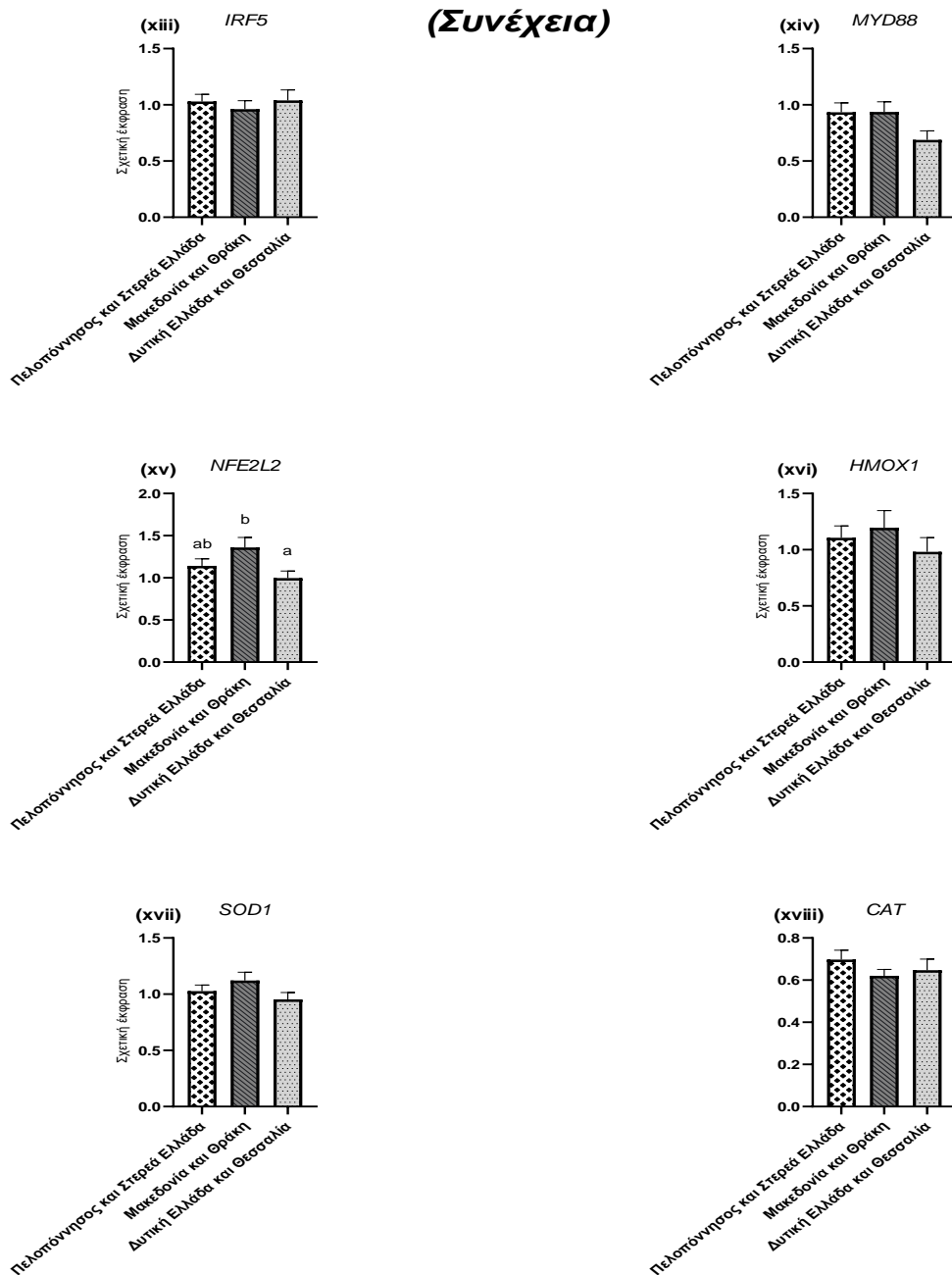
Τα δείγματα AW χωρίστηκαν ως προς τη γεωγραφική προέλευση συλλογής τυρογάλακτος σε 3 περιφέρειες, οι οποίες είναι ως ακολούθως: Πελοπόννησος και Στερεά (n=15), Μακεδονία και Θράκη (n=8) και Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία (n=10). Για τα δείγματα AW-D-P3 που συλλέχθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη και επώαστηκαν για 24 ώρες σε THP-1 μακροφάγα, έδειξαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA ($p \leq 0,05$) για τα γονίδια *LST1* και *NFE2L2* σε σύγκριση με εκείνα που συλλέχθηκαν από τη Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία (διάγραμμα 4.12 (v) και (xv)). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) στη γονιδιακή έκφραση των *IL1B*, *CXCL8*, *IL6*, *TGFB1*, *ICAM1*, *NFKB1*, *RELA*, *TLR2*, *TLR4*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF5*, *MYD88*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT* δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση AW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.12 (i)-(iv), (vi)-(xiv), (xvi)-(xviii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



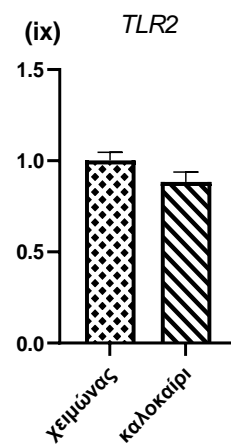
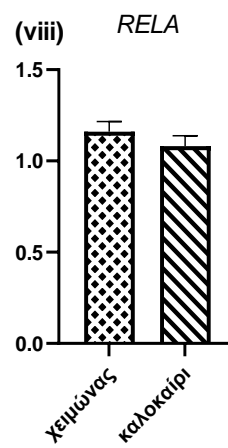
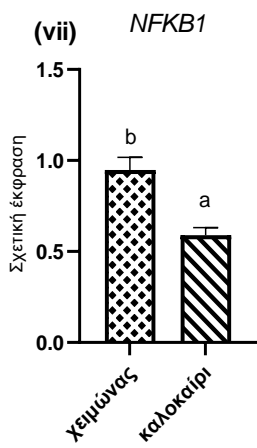
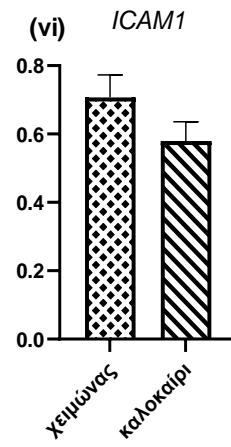
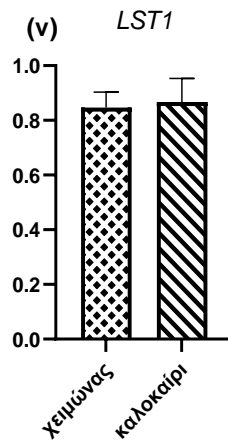
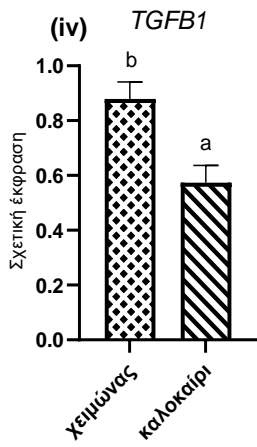
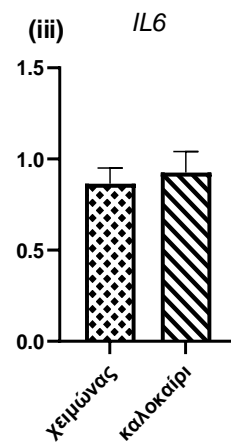
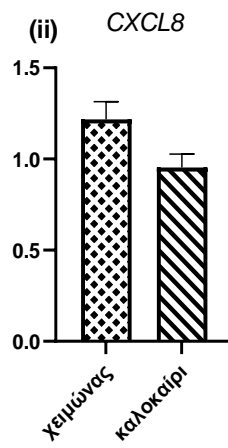
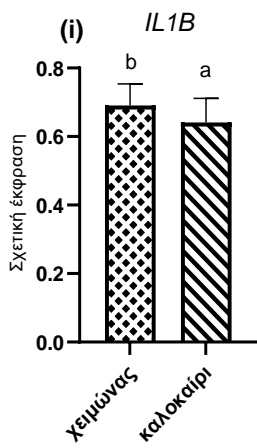
(Συνέχεια)



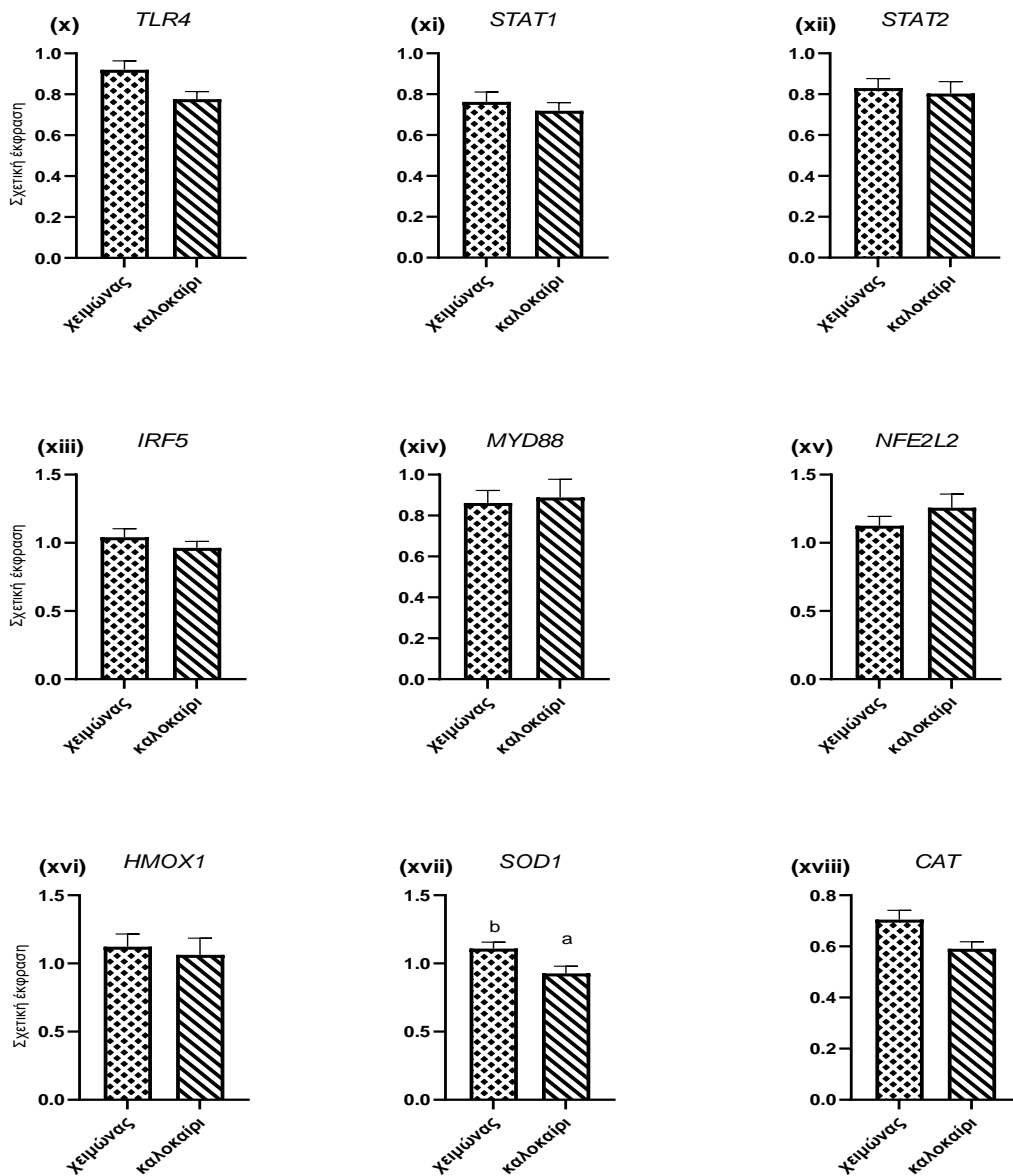
Διάγραμμα 4.12 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFB1* (v) *LST1*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

✚ Ως προς την εποχικότητα

Τα AW χωρίστηκαν σε δύο ομάδες όσον αφορά τον παράγοντα μελέτης της εποχικότητας, με τα καλοκαιρινά AW να έχουν συλλεχθεί από 1^η Μαΐου-30^η Οκτώβρη (n=20) ενώ τα χειμερινά συλλέχθηκαν από 1^η Νοέμβρη-30^η Απρίλη (n=13). Στο διάγραμμα 4.13 παρατηρείται πως μόνο τα επίπεδα mRNA των *IL1B*, *TGFB*, *NKBI* και *SOD1* διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p \leq 0,05$) μεταξύ καλοκαιρινών και χειμερινών AW-D-P3, με αυτά που συλλέχθηκαν το χειμώνα να φέρουν αυξημένα επίπεδα (διάγραμμα (i), (iv), (vii), (xvii)). Τέλος, δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) της γονιδιακής έκφρασης των *CXCL8*, *IL6*, *LST1*, *ICAM1*, *RELA*, *TLR2*, *TLR4*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF5*, *MYD88*, *NFE2L2*, *HMOX1* και *CAT* σε THP-1 κύτταρα που εκτέθηκαν σε AW-D-P3 συγκρίνοντας ως προς την εποχικότητα (διάγραμμα 4.13 (ii), (iii), (v), (vi), (viii)-(xvi) και (xviii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



Διάγραμμα 4.13 Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *TGFβ1* (v) *LST1*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

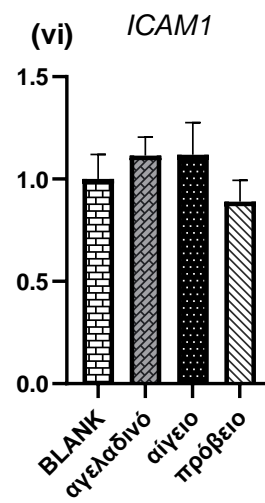
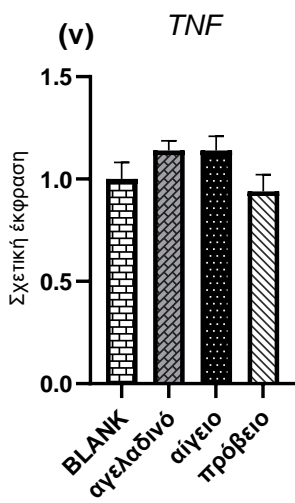
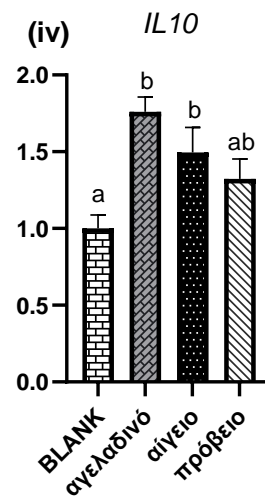
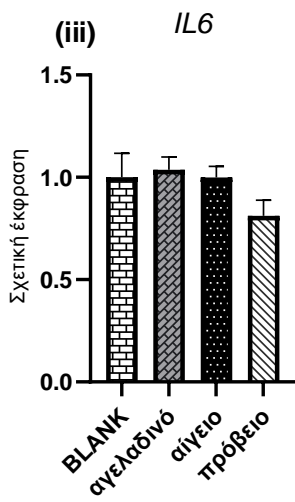
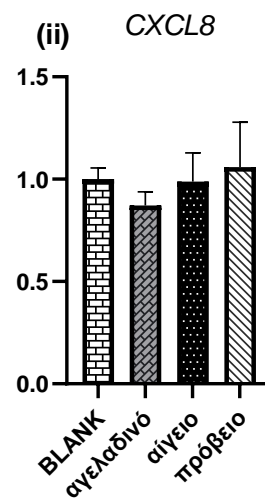
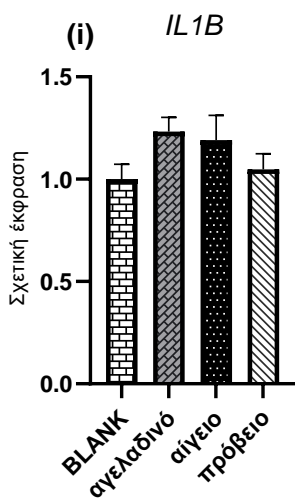
4.1.2.2 Γονιδιακή έκφραση σε ενεργοποιημένα THP-1 μακροφάγα

✚ Ως προς τη ζωική προέλευση

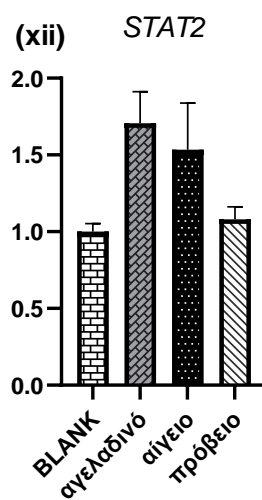
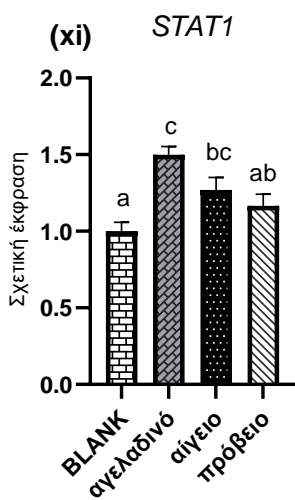
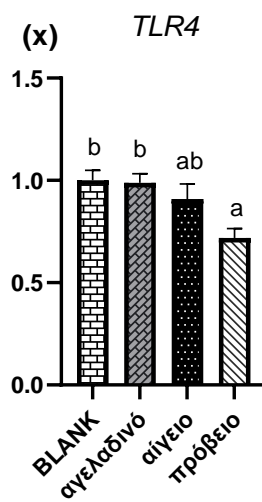
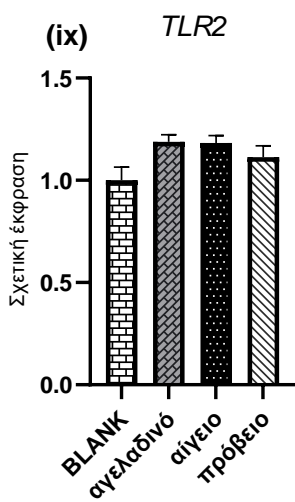
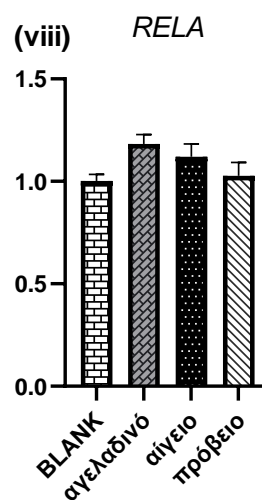
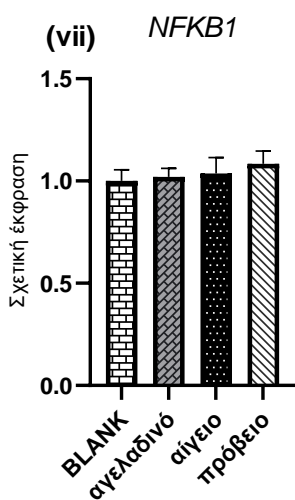
Στο διάγραμμα 4.14 παρουσιάζεται η σχετική έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή ρύθμιση, σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα ύστερα από ταυτόχρονη επώαση των AW-D-P3 με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Ύστερα, συγκρίθηκαν τόσο με το BL-D-P3 όσο και μεταξύ τους τα AW-D-P3, λαμβάνοντας υπόψιν τη διαφορετική ζωική προέλευση του γάλακτος (αγελαδινό, αίγιο, πρόβιο).

Στο διάγραμμα 4.14 (x) και (xiii) παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p \leq 0,05$) της έκφρασης του *TLR4* και *IRF5* σε ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 που επώαστηκαν με το πρόβιο AW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3. Ομοίως, στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώθηκε και ανάμεσα σε αγελαδινό και πρόβιο AW-D-P3 στη γονιδιακή έκφραση του *TLR4*. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής έκφρασης των *IL10* και *STAT1* (διάγραμμα 4.14 (iv) και (xi) αντίστοιχα) στο αγελαδινό και αίγιο AW-D-P3 σε σύγκριση με BL-D-P3, ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που επώαστηκαν με αγελαδινό SW-D-P3 έδειξαν ακόμη μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης του *STAT1* σε σχέση με εκείνα του πρόβιου AW-D-P3.

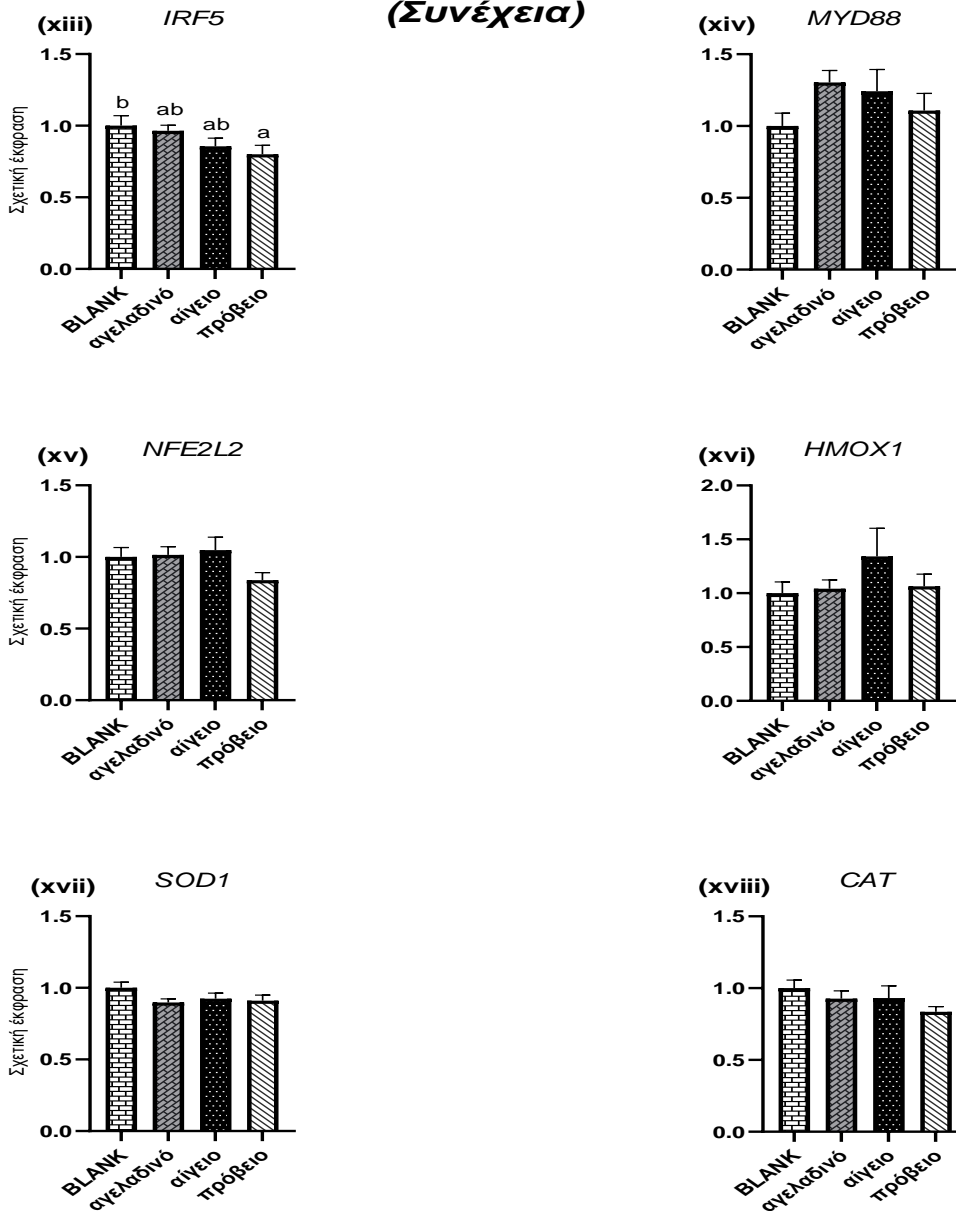
Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$) στη γονιδιακή έκφραση των *IL1B*, *CXCL8*, *IL6*, *TNF*, *ICAM1*, *NFKB1*, *RELA*, *TLR2*, *STAT2*, *NFE2L2*, *MYD88*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT* δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση AW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.14 (i)-(iii), (v)-(ix), (xii), (xiv)-(xviii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



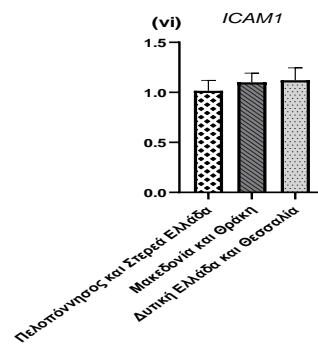
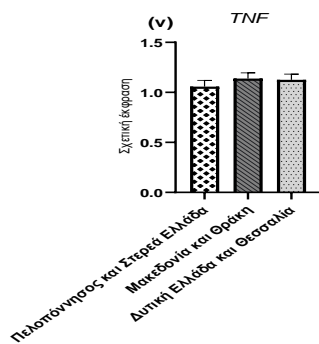
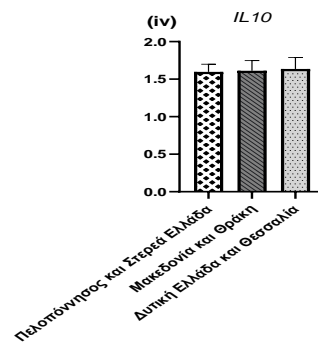
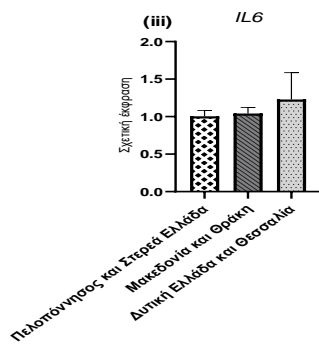
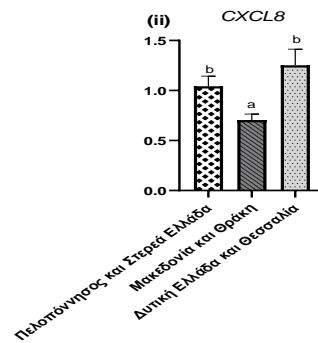
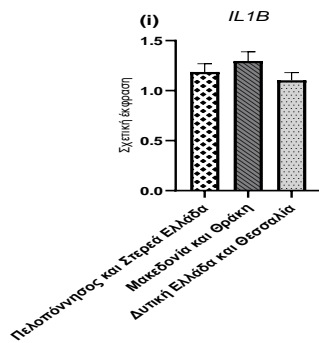
(Συνέχεια)



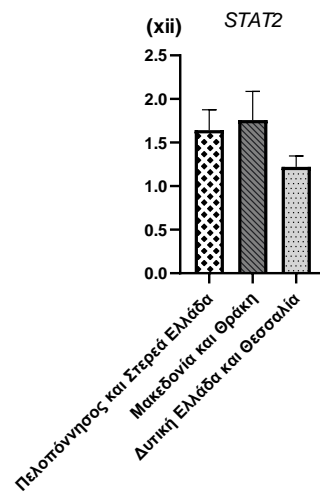
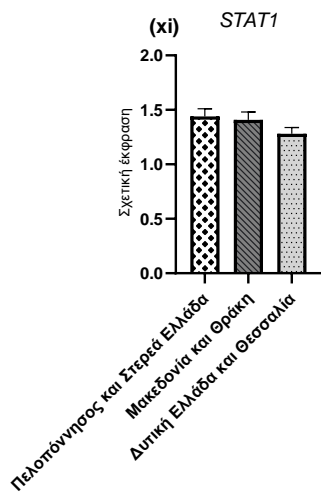
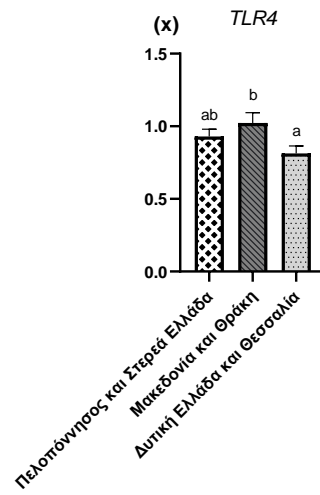
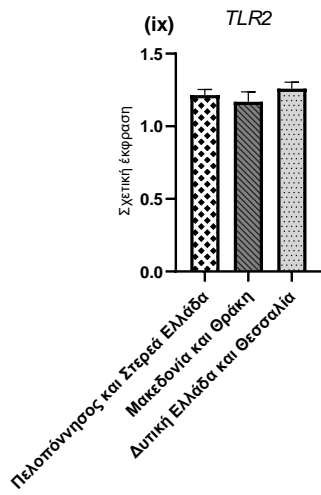
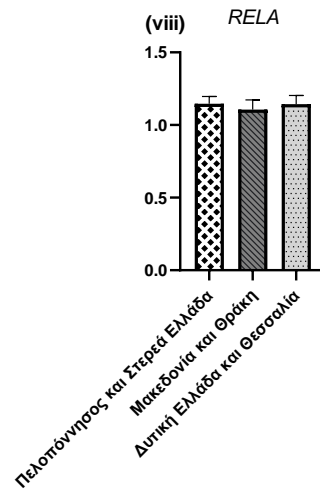
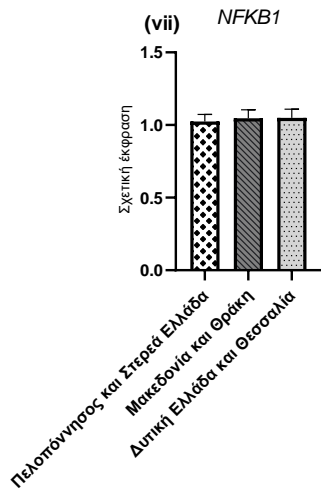
Διάγραμμα 4.14 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM. Στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Ως προς τη γεωγραφική προέλευση

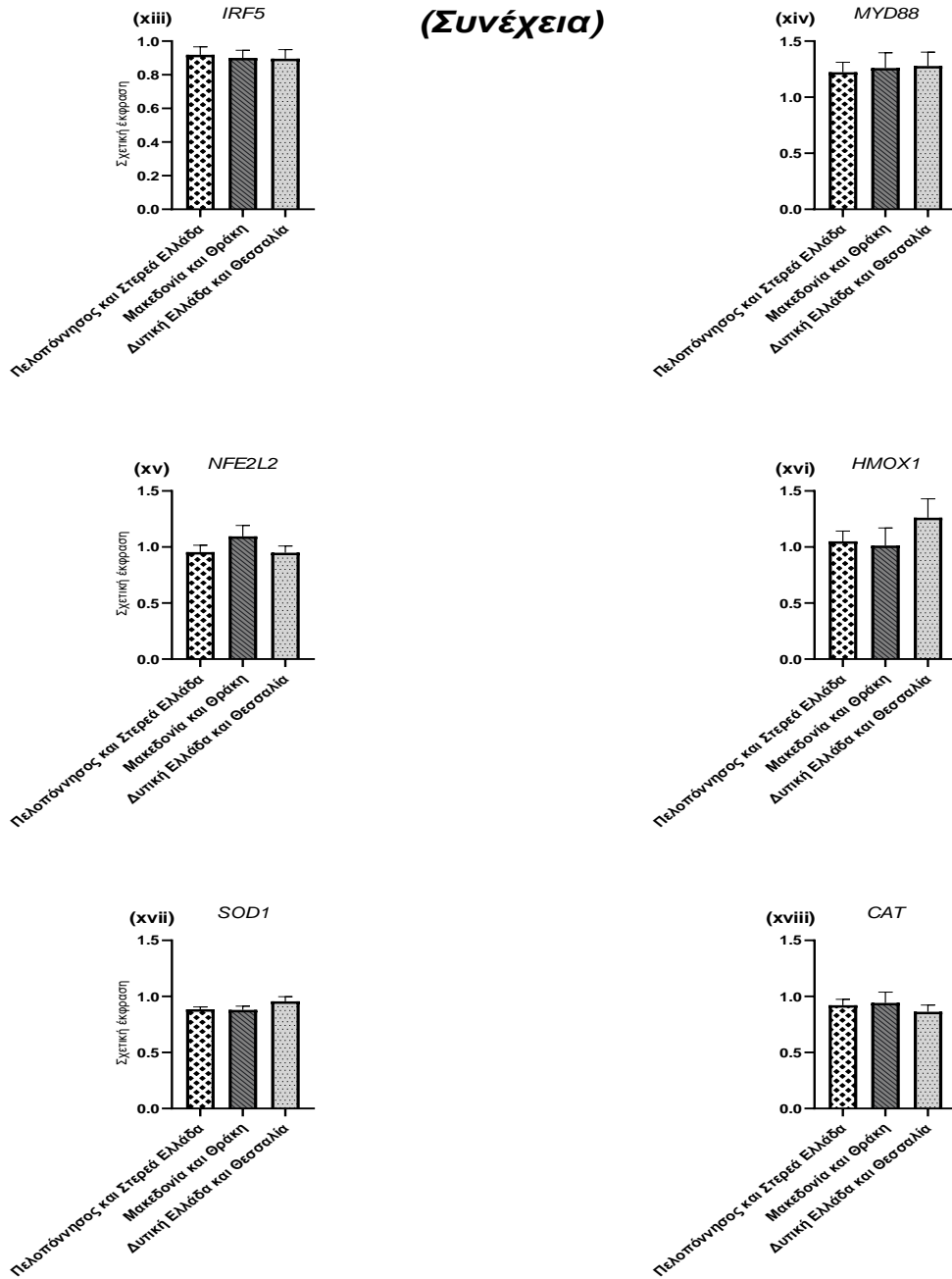
Στα αποτελέσματα του διαγράμματος 4.15 αποτυπώνεται πως τα δείγματα AW που συλλέχθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη και εκτέθηκαν τα κλάσματα τους, AW-D-P3, για 24 ώρες σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα, έδειξαν τα υψηλότερα επίπεδα mRNA ($p \leq 0,05$) για τον υποδοχέα *TLR4* σε αντίθεση με τη χημειοκίνη *CXCL8* που παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα mRNA (διάγραμμα 4.15 (x) και (ii) αντίστοιχως). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0,05$) στη σχετική έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων, *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *ICAM1*, *NFKB1*, *RELA*, *TLR2*, *STAT1*, *STAT2*, *IRF5*, *MYD88*, *NFE2L2*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT*, δεν παρατηρήθηκε έπειτα από την έκθεση AW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα (διάγραμμα 4.15 (i), (iii)-(ix), (xi)-(xviii) αντίστοιχα).



(Συνέχεια)



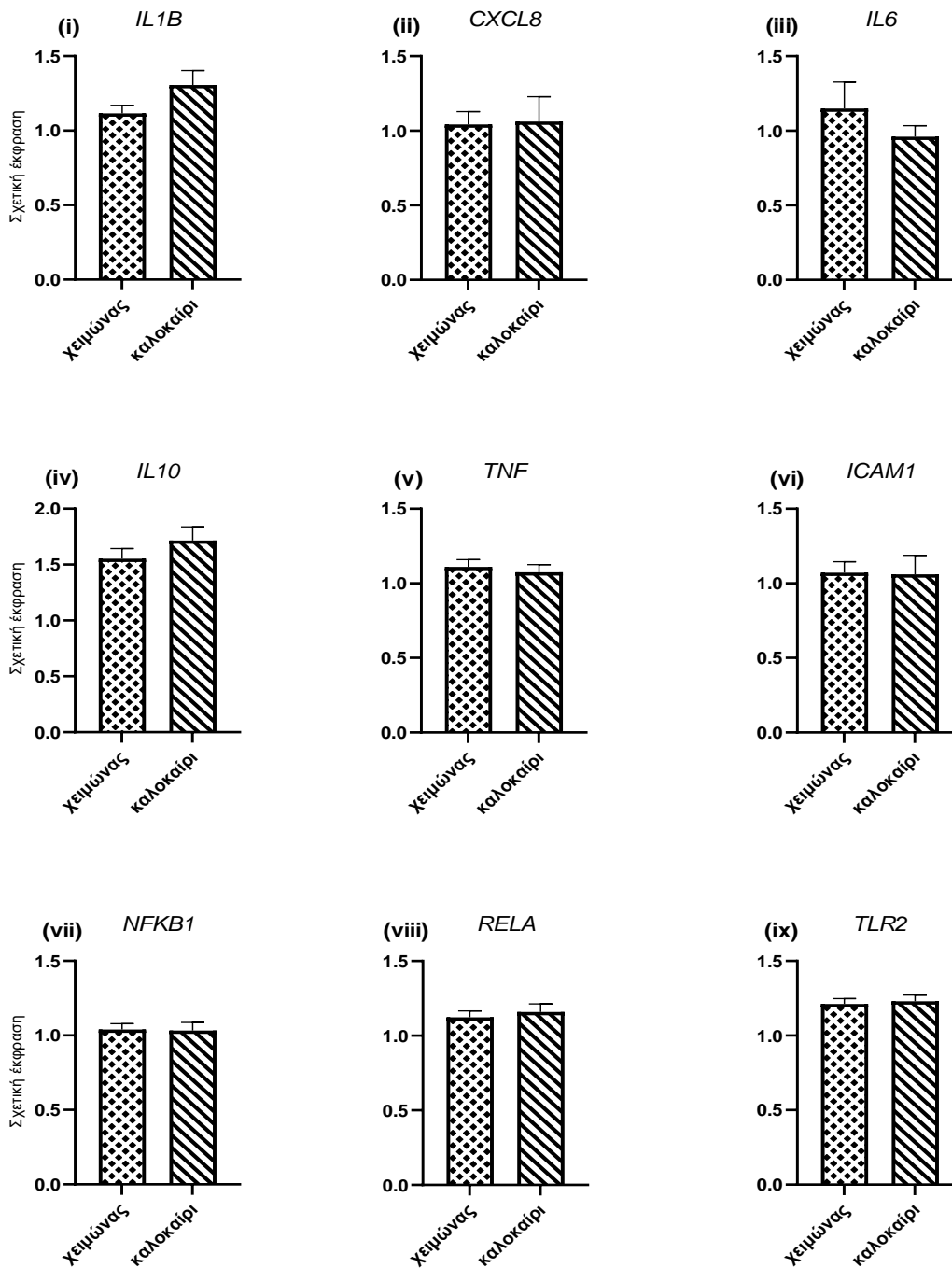
(Συνέχεια)



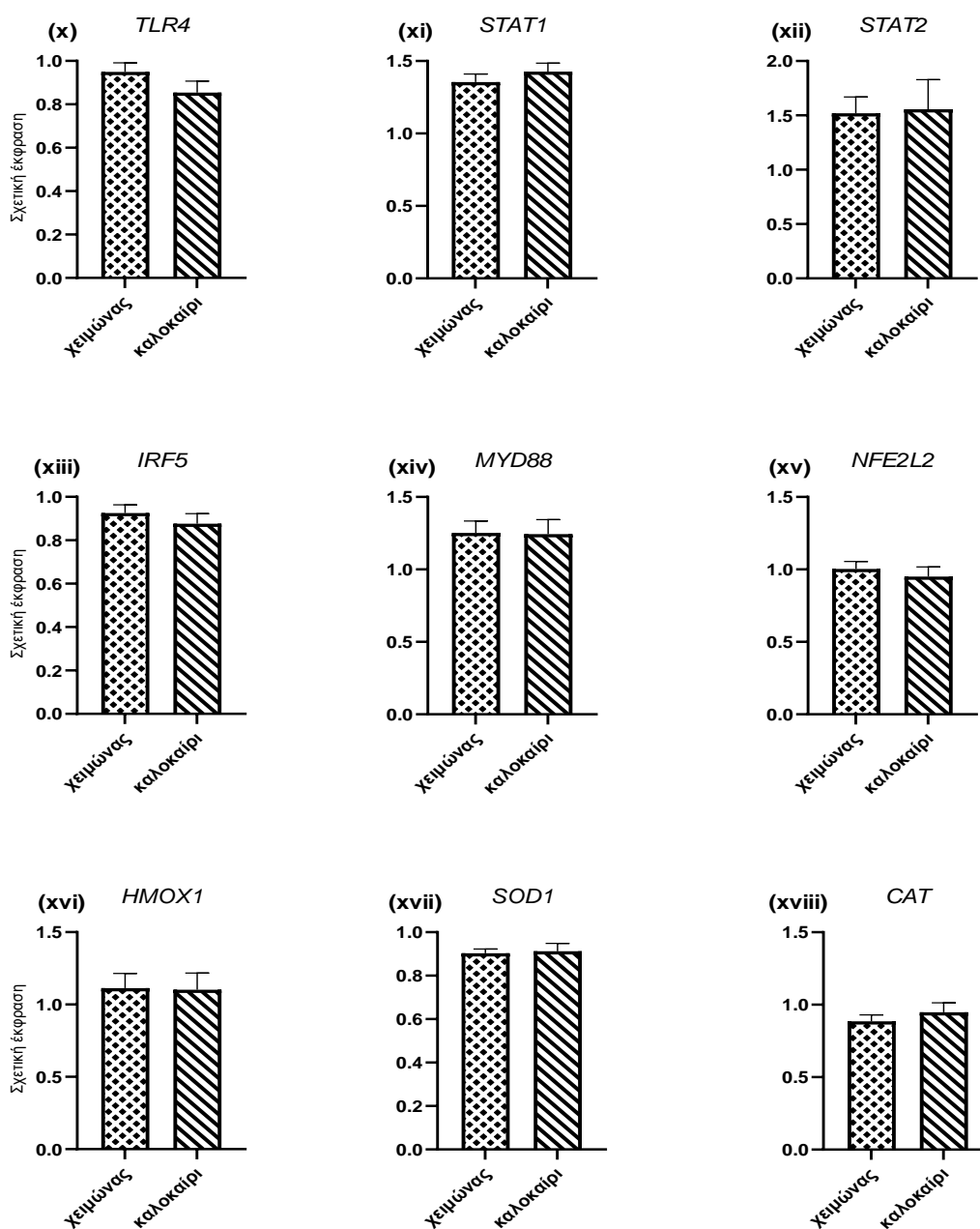
Διάγραμμα 4.15 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

Ως προς την εποχικότητα

Αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα ύστερα από την έκθεση τους σε AW-D-P3 για 24 ώρες και παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.16 (i)-(xviii), χωρίς ωστόσο, να εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές αλλαγές ($p \geq 0,05$) σε κανένα από τα υπό μελέτη γονίδια για τον παράγοντα της εποχικότητας.



(Συνέχεια)

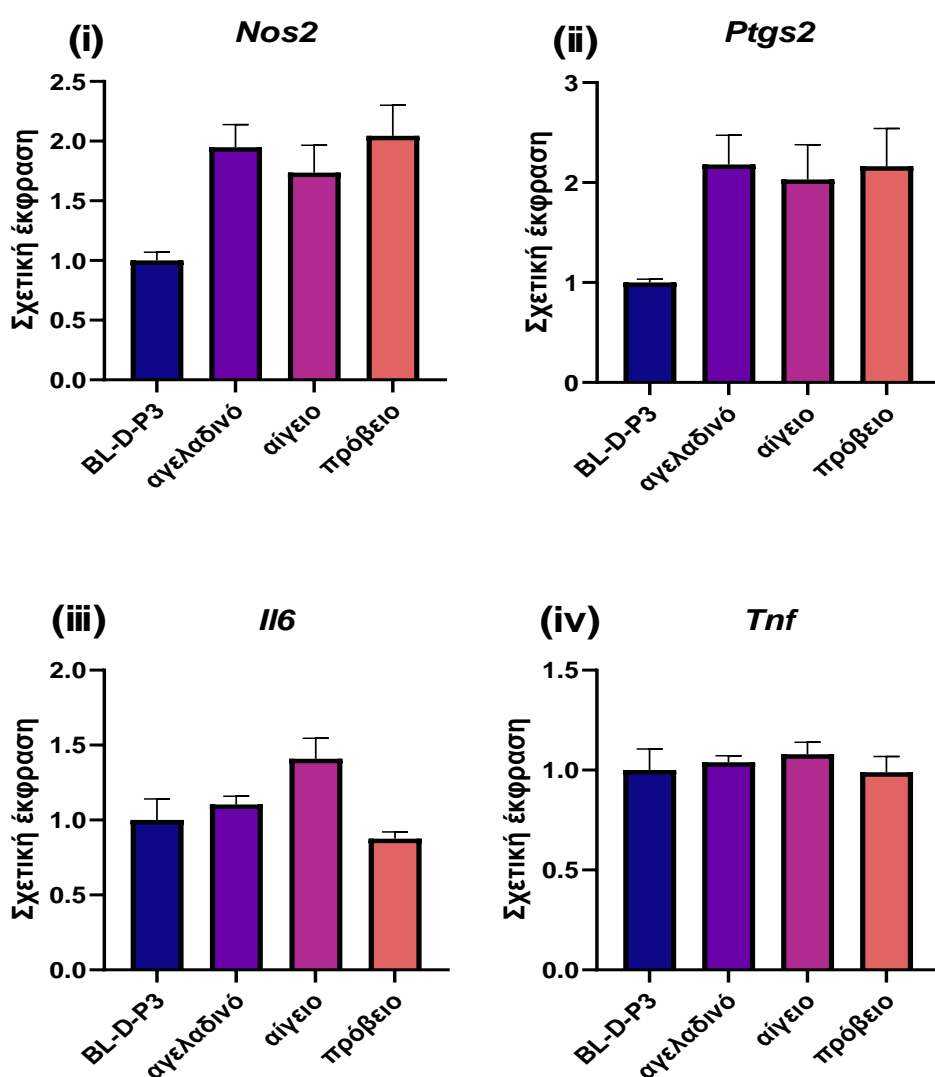


Διάγραμμα 4.16 Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των (i) *IL1B*, (ii) *CXCL8*, (iii) *IL6*, (iv) *IL10* (v) *TNF*, (vi) *ICAM1*, (vii) *NFKB1*, (viii) *RELA*, (ix) *TLR2*, (x) *TLR4*, (xi) *STAT1*, (xii) *STAT2*, (xiii) *IRF5*, (xiv) *MYD88*, (xv) *NFE2L2*, (xvi) *HMOX1*, (xvii) *SOD*, (xviii) *CAT* σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 100 ng/mL LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *B2M*, *HPRT1*, *RPS18* και *RPL37A* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

4.1.2.3 Γονιδιακή έκφραση σε ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα

Η αντιφλεγμονώδης δράση του AW-D-P3 (0,9 mg πρωτεΐνης/mL) αξιολογήθηκε στα RAW 264.7, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, μακροφάγα, λαμβάνοντας υπ' όψιν δύο βασικές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (*Tnf* και *Il6*) και δύο κύριους μεσολαβητές (*Nos2* και *Ptgs2*), σε μοριακό επίπεδο.

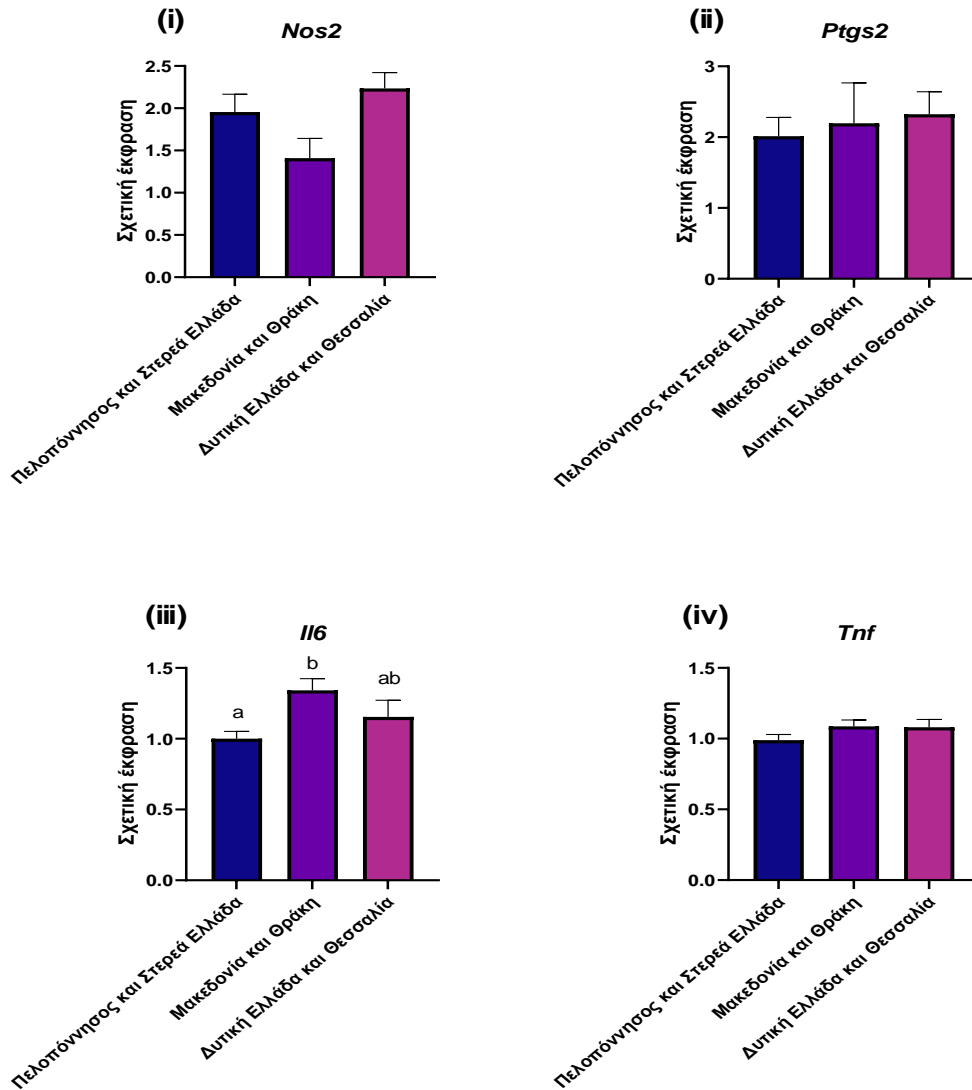
Δε σημειώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση κανενός από τα 4 προαναφερθέντα γονίδια (*Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* και *Tnf*) τόσο μεταξύ αγελαδινού, αίγιου και πρόβειου AW-D-P3 όσο και με το BL-D-P3, όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.17 (i), (ii), (iii) και (iv) αντιστοίχως.



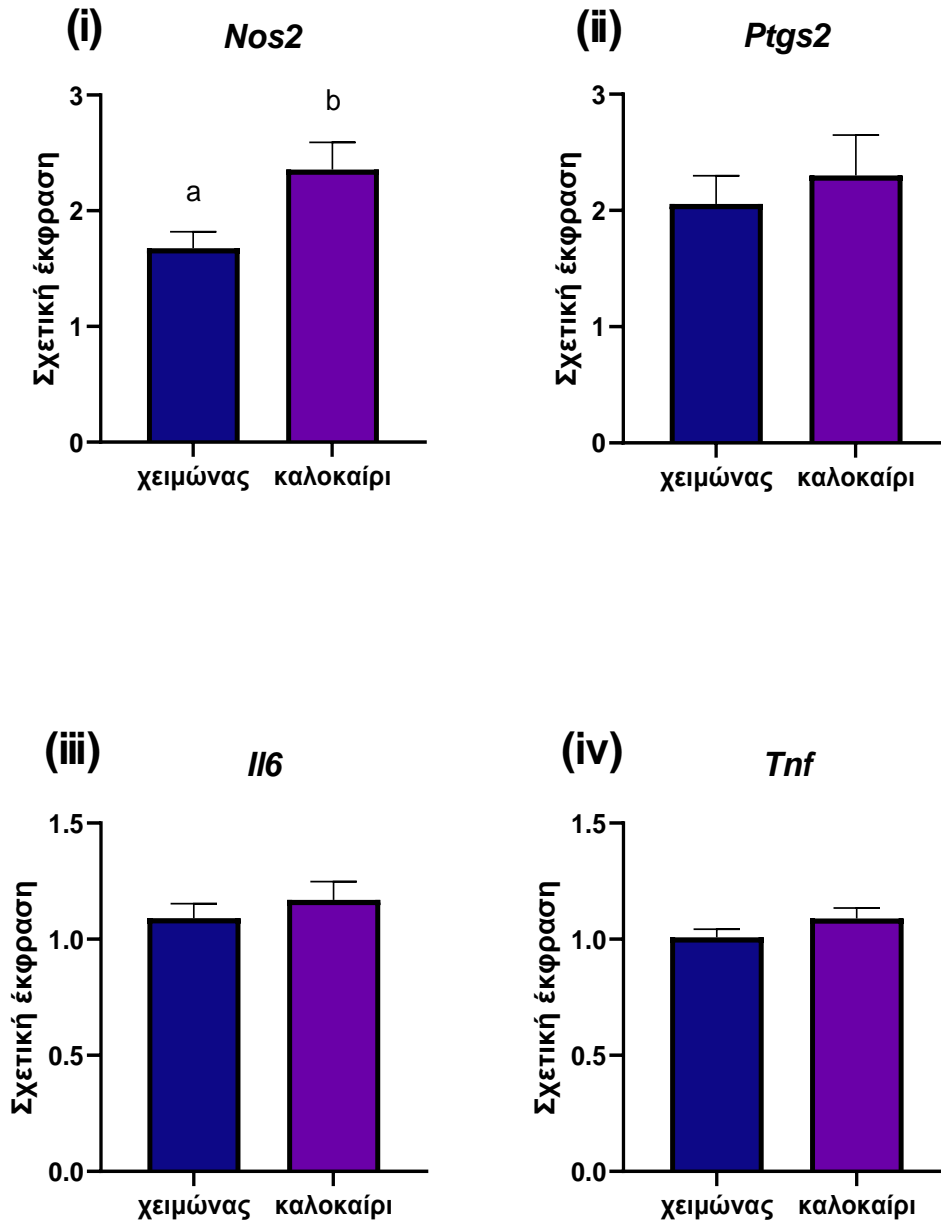
Διάγραμμα 4.17 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA

μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cycl* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

Σχετικά με τη γεωγραφική προέλευση από τα οποία προήλθαν τα δείγματα του AW που φαίνονται στο διάγραμμα 4.18, παρατηρήθηκε πως μόνο η σχετική έκφραση του *Il6* (διάγραμμα 4.18 (iii)) είχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$) μεταξύ δειγμάτων που είχαν συλλεχθεί από την Πελοπόννησο και Στερεά Ελλάδα σε σύγκριση με εκείνα της Μακεδονίας και Θράκης. Τέλος, στο διάγραμμα 4.19 εμφανίζεται η επίδραση του AW-D-P3 βάσει της εποχικότητας στη γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf*, με τη μοναδική σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$) να εντοπίζεται όσον αφορά τα επίπεδα mRNA του *Nos2* (διάγραμμα 4.19 (i)), με τα χειμερινά AW-D-P3 να εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα *Nos2* σε σύγκριση με τα καλοκαιρινά AW-D-P3.



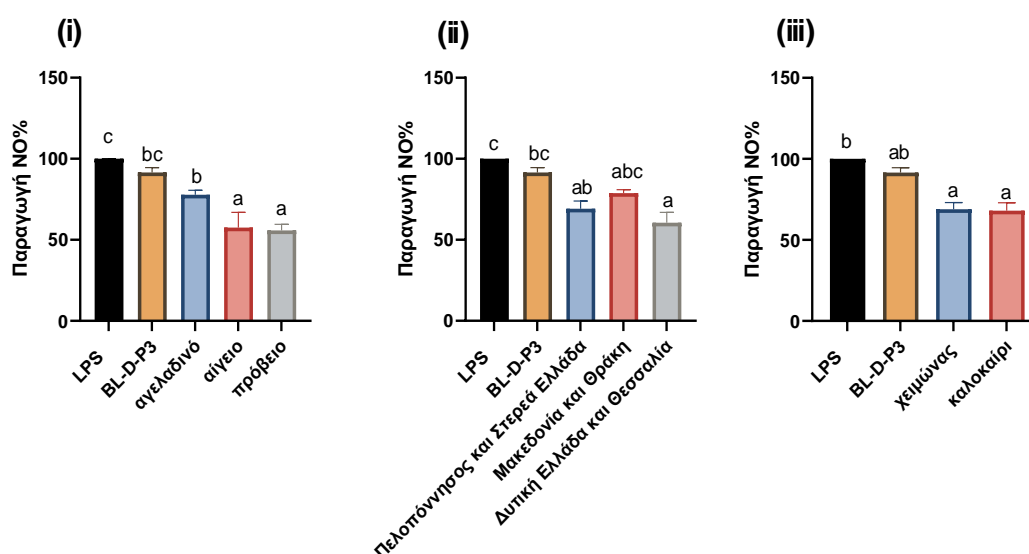
Διάγραμμα 4.18 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν με χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cyc1* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.19 Επίδραση της εποχικότητας του AW-D-P3 στη σχετική γονιδιακή έκφραση των i) *Nos2*, ii) *Ptgs2*, iii) *Il6* και iv) *Tnf* σε RAW 264.7 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA μετρήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν με χρησιμοποιώντας τα *Actb* και *Cyc1* ως γονίδια αναφοράς. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.1.2.4 Αναστολή παραγωγής νιτρικού οξέος

Για τη διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης του AW-D-P3 σε διεγερμένα με LPS, μακροφάγα RAW 264.7, προσδιορίστηκε η παραγωγή του νιτρικού οξέος % με τη μέθοδο Griess (σε κυτταρικό επίπεδο). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται στο διάγραμμα 4.20 (i) πως υπάρχει επίδραση του AW-D-P3 στην παραγωγή του NO% στα ενεργοποιημένα μακροφάγα ως προς τη ζωική προέλευση του ΟΟΓ, με στατιστικώς σημαντική μείωση NO να σημειώνεται για όλα τα είδη AW (αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο) σε σχέση με την ομάδα LPS. Ακόμη μεγαλύτερη αναστολή του NO ($p \leq 0,05$) σημειώθηκε για το αίγαιο και πρόβειο σε σύγκριση με το αγελαδινό AW-D-P3 (διάγραμμα 4.20 (i)). Επίσης, όπως παρατηρείται στα διαγράμματα 4.20 (ii) και (iii), οι παράγοντες της γεωγραφικής προέλευσης και της εποχικότητας αντίστοιχα, δεν επίδρασαν στην παραγωγή NO%. Σε σύγκριση με τα BL-D-P3 παρατηρήθηκε αναστολή του NO ($p \leq 0,05$) σε σύγκριση με τα AW-D-P3 που συλλέχθηκαν από τη Δυτική Ελλάδα και τη Θεσσαλία διάγραμμα 4.20 (ii)).

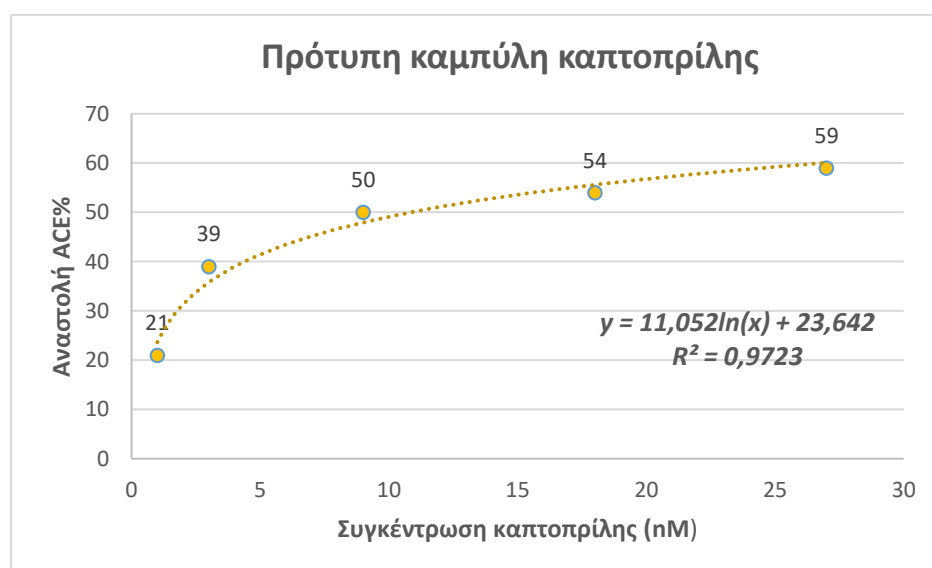


Διάγραμμα 4.20 Επίδραση του AW-D-P3 στην παραγωγή νιτρικού οξέος % σε LPS ενεργοποιημένα RAW 264.7 μακροφάγα ως προς: i) την ζωική προέλευση, ii) τη γεωγραφική προέλευση και iii) την εποχικότητα. Η διεγερση των RAW 264.7 κύτταρων (5×10^5 κύτταρα/ml) πραγματοποιήθηκε με 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα % ως προς το LPS (control; κύτταρα μόνο με LPS). Αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.2 Αποτελέσματα αντιυπερτασικής δράσης

Αρχικά υπολογίστηκε η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) της καπτοπρίλης. Είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας και υποδεικνύει την ποσότητα συγκεκριμένου φαρμάκου (ως αναστολέα) που χρειάζεται για να αναστείλει κατά το ήμισυ τη δεδομένη βιολογική διαδικασία. Σύμφωνα με τον FDA, η IC50 αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για 50% *in vitro* αναστολή. Οι τιμές τυπικά εκφράζονται ως γραμμομοριακή συγκέντρωση.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ανασταλτικής δράσης της καπτοπρίλης, ενός συνθετικού αντιυπερτασικού φαρμάκου. Ελέγχθηκε στις ίδιες συνθήκες με αυτές των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Για την επικύρωση της μεθόδου, προστέθηκε καπτοπρίλη σε διάφορες συγκεντρώσεις και προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ACE. Η αντιυπερτασική δράση της καπτοπρίλης αξιολογήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 1-27 nM (διάγραμμα 4.21) και υπολογίστηκε πως η IC50 ήταν περίπου στα 9 nM, υπό τις συνθήκες ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.



Διάγραμμα 4.21 Πρότυπη καμπύλη καπτοπρίλης σε εύρος συγκεντρώσεως 1-27 nM για τον έλεγχο εγκυρότητας της μεθόδου

4.2.1 Αποτελέσματα αντιυπερτασικής δράσης για το τυρόγαλα

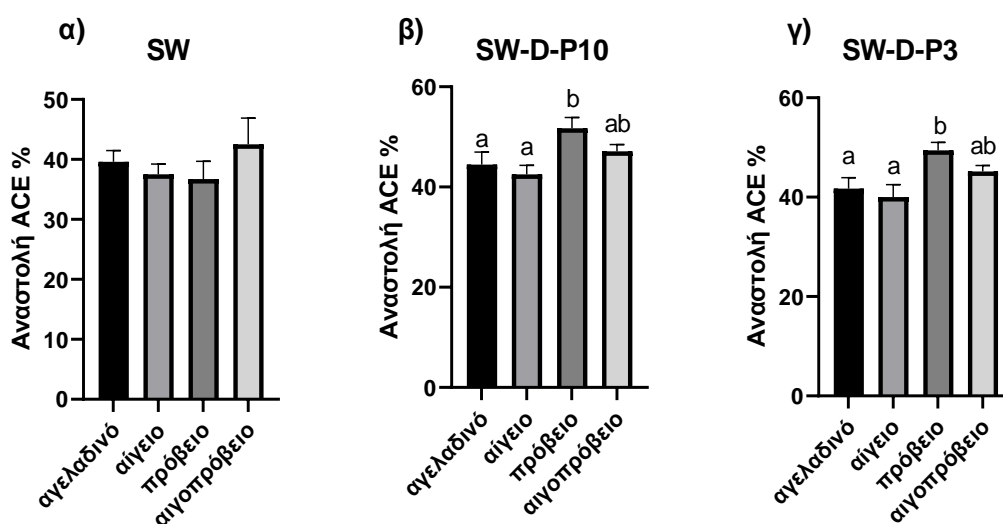
Αναφορικά με την επίδραση της ζωικής προέλευσης (αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο, αιγοπρόβειο) του τυρογάλακτος στην αντιυπερτασική δράση των κλαμάτων πριν και μετά την πέψη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στο διάγραμμα 4.22. Η αναστολή του

ACE% παρουσιάστηκε να είναι σημαντικά υψηλότερη ($p \leq 0.05$) στο πρόβειο τυρογάλα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες για τα SW-D-P10 και SW-D-P3. Τα δύο αυτά κλάσματα προκύπτουν με την *in vitro* πέψη και την κλασμάτωση με μεμβράνες υπερδιήθησης μοριακού βάρους αποκοπής 10 kDa και 3 kDa αντίστοιχα. Για τα δείγματα πριν τη πέψη δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά τη ζωική προέλευση του τυρογάλακτος. Αξίζει να σημειωθεί πως η αναστολή του ACE% παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αύξηση μετά την *in vitro* πέψη, χωρίς να υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα 2 κλάσματα μετά τη πέψη (πίνακας 4.1)

Πίνακας 4.1 Ανασταλτική δράση του ενζύμου ACE %, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης τυρογάλακτος, πριν και μετά την *in vitro* γαστρεντερική πέψη

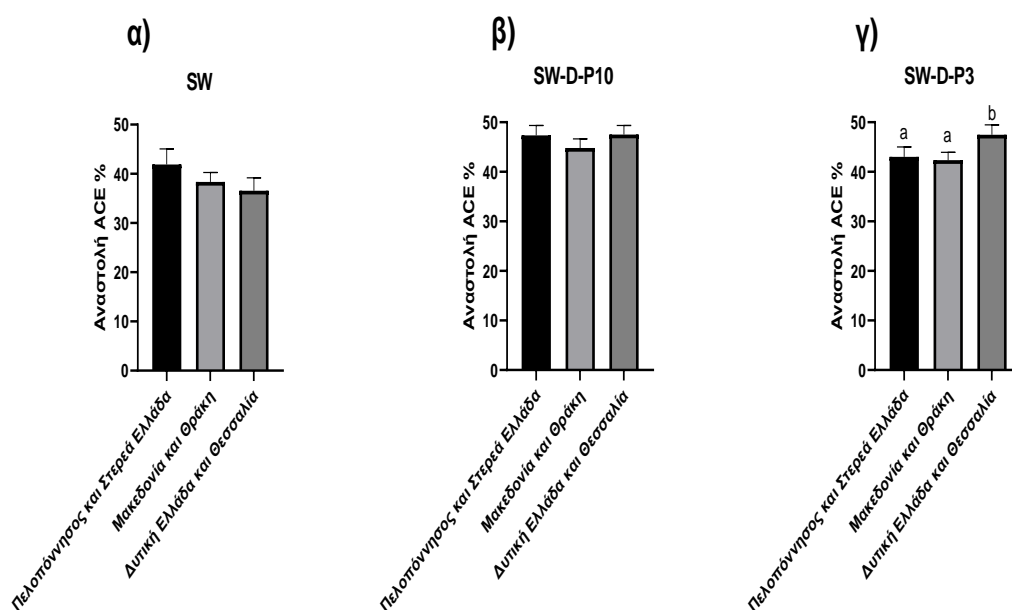
Δείγματα	Αναστολή ACE%
SW	39,12±1,50 ^a
SW-D-P10	46,45±1,10 ^b
SW-D-P3	44,08±1,10 ^b

*Τα διαφορετικά γράμματα ανά γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)

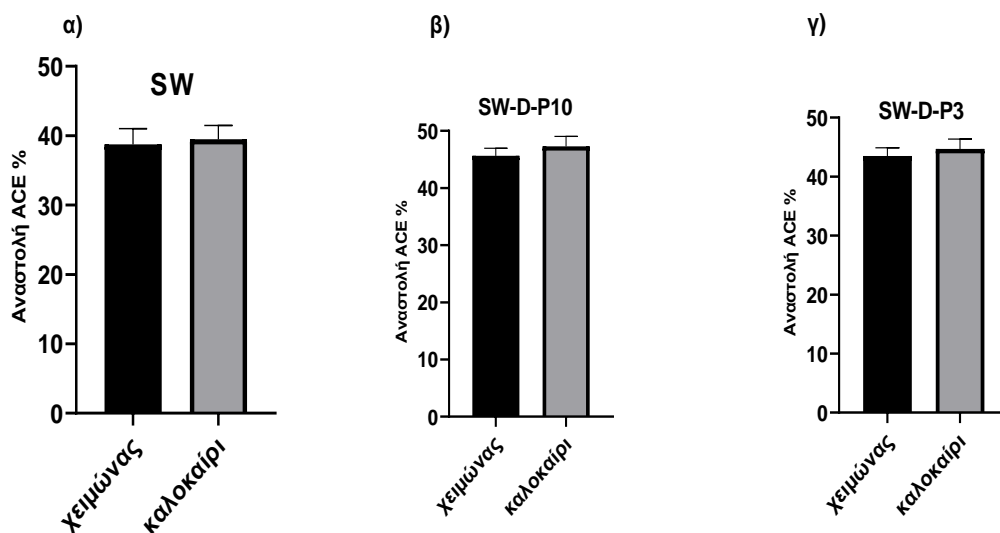


Διάγραμμα 4.22 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει ζωικής προέλευσης τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν τα ίδια δείγματα τυρογάλακτος ως προς τη γεωγραφική προέλευση. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά για SW και SW-D-P10. Στατιστικώς σημαντική διαφορά εντοπίστηκε για το κλάσμα SW-D-P3 ($p \leq 0.05$), με υψηλότερες τιμές να λαμβάνει η Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες (διάγραμμα 4.23). Τέλος, όσον αφορά την εποχικότητα του τυρογάλακτος δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$), ανάμεσα σε χειμερινά και καλοκαιρινά δείγματα για SW, SW-D-P10 και SW-D-P3 (διάγραμμα 4.24).



Διάγραμμα 4.23 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει γεωγραφικής προέλευσης τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.24 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει εποχικότητας τυρογάλακτος, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

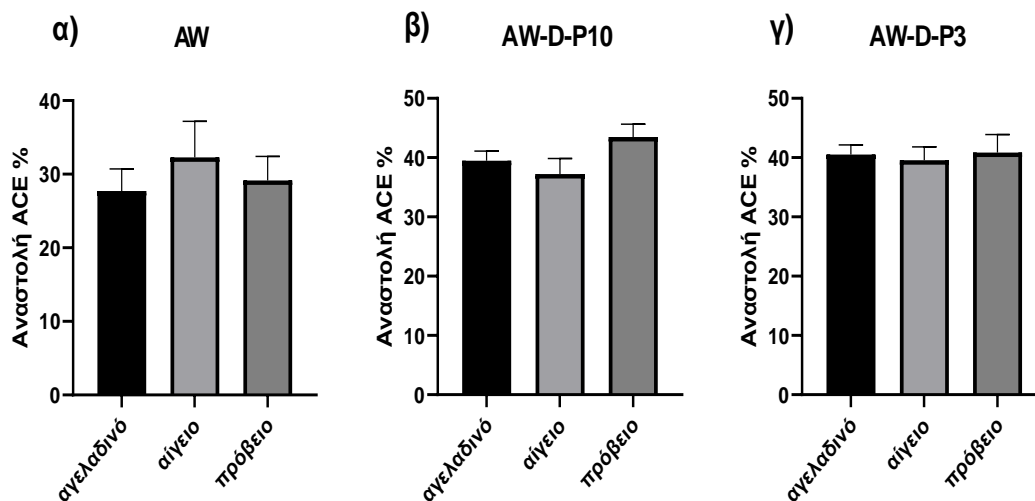
4.2.2 Αποτελέσματα αντιπερτασικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης

Στον πίνακα 4.2 παρατηρείται στατιστικά υψηλότερη αντιπερτασική δράση ($p \leq 0.05$) για τον ΟΟΓ μετά την *in vitro* γαστρεντερική πέψη (AW-D-P10 και AW-D-P3), ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης. Στη συνέχεια δεν εντοπίστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$) ούτε ανάμεσα στα διαφορετικά είδη ΟΟΓ (Διάγραμμα 4.25) ούτε ανάμεσα στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Διάγραμμα 4.26) για τα δείγματα του ΟΟΓ πριν (AW) και μετά την πέψη (AW-D-P10 και AW-D-P3).

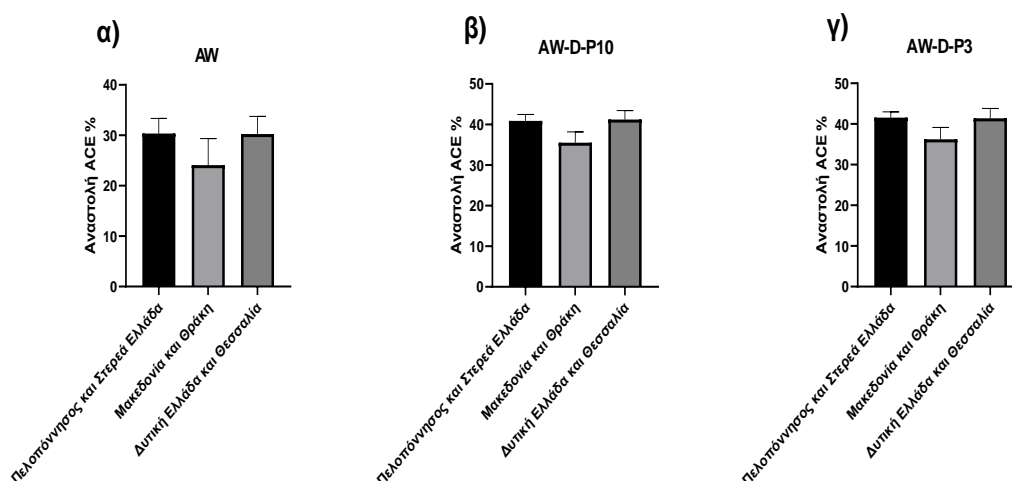
Πίνακας 4.2 Ανασταλτική δράση του ενζύμου ACE %, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης ΟΟΓ, πριν και μετά την *in vitro* γαστρεντερική πέψη

Δείγματα	Αναστολή ACE%
AW	27,93±2,10 ^a
AW-D-P10	39,44±1,17 ^b
AW-D-P3	40,71±1,16 ^b

*Τα διαφορετικά γράμματα ανά γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)



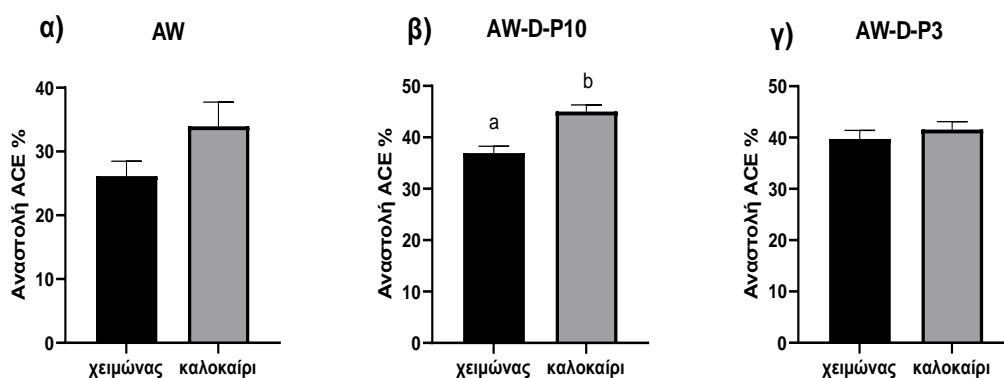
Διάγραμμα 4.25 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει ζωικής προέλευσης ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος± SEM.



Διάγραμμα 4.26 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει γεωγραφικής προέλευσης ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SEM.

Τέλος, αναφορικά με την επίδραση της εποχικότητας (χειμερινά, καλοκαιρινά) του ΟΟΓ στην αντιυπερτασική δράση των κλαμάτων πριν και μετά την πέψη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στο διάγραμμα 4.27. Παρατηρήθηκε μια τάση για πιο υψηλές τιμές στην ανασταλτική δράση του ACE για τα δείγματα του ΟΟΓ που η

συλλογή τους πραγματοποιήθηκε τους καλοκαιρινούς μήνες, με στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) να εντοπίζεται μόνο στο κλάσμα AW-D-P10.



Διάγραμμα 4.27 Ανασταλτική δραστηριότητα του ACE βάσει εποχικότητας ΟΟΓ, εκφρασμένη ως %, α) πριν την πέψη, β) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 10 kDa (μετά την πέψη) και γ) διαπερατό κλάσμα από μεμβράνη 3 kDa (μετά την πέψη). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.3 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων εκτιμήθηκε πριν και μετά την *in vitro* γαστρεντερική πέψη μέσω τεσσάρων διαφορετικών βιοχημικών δοκιμασιών (ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική προστατευτική δράση των κλασμάτων με πεπτίδια μοριακού βάρους <3 kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3) σε κύτταρα HT-29 που είχαν υποβληθεί σε οξειδωτικό στρες (παρουσία H₂O₂). Στα *in vitro* βιολογικά συστήματα, σε αντίθεση με τις βιοχημικές μεθόδους ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας, συνυπολογίζεται και η ικανότητα του αντιοξειδωτικού να δεσμεύει μέταλλα, να κατανέμεται στα λιπιδικές μεμβράνες όπου λαμβάνει χώρα εκτεταμένη οξείδωση και να αλληλεπιδρά με άλλες αντιοξειδωτικές ή προ-οξειδωτικές ενώσεις. Θεωρείται σημαντικός και αξιόπιστος δείκτης των επιπέδων της βιολογικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Με αυτόν τον τρόπο, παρουσιάζεται μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το αντιοξειδωτικό δυναμικό των υπό μελέτη γαλακτοκομικών υποπροϊόντων.

4.3.1 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης για το τυρόγαλα

4.3.1.1 Βιοχημικές μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης τυρογάλακτος

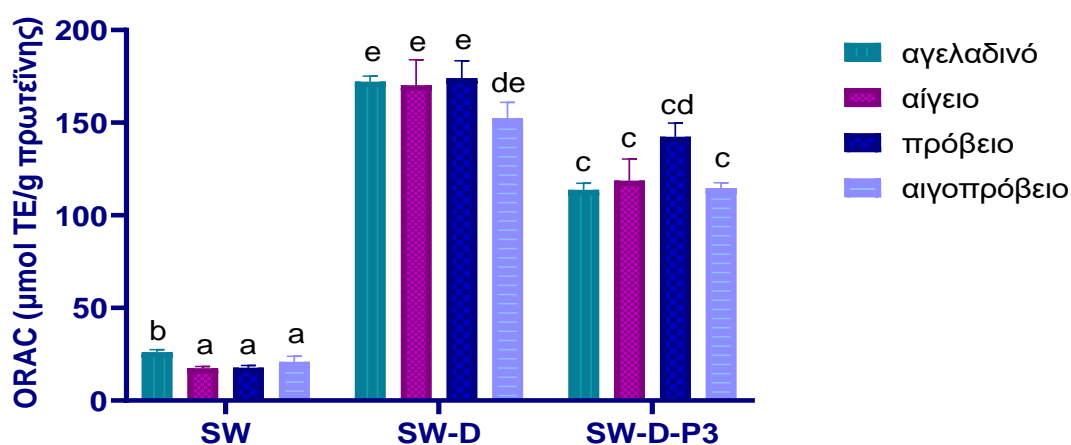
Στον πίνακα 4.3 παρουσιάζεται μία συνολική εικόνα των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων SW, SW-D και SW-D-P3 με τις μεθόδους της ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS, πριν και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης. Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) των επιπέδων της αντιοξειδωτικής δράσης του τυρογάλακτος μετά τη διαδικασία της γαστρεντερικής πέψης σε όλες τις βιοχημικές μεθόδους και ανεξαρτήτως προέλευσης του γάλακτος. Η διαδικασία της πέψης είχε θετική επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του τυρογάλακτος, παρατηρώντας 2-4 φορές αύξηση για τις μεθόδους FRAP, P-FRAP και ABTS. Στην ORAC σημειώθηκε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων τυρογάλακτος μετά την πέψη, περίπου 8 φορές. Μία ακόμη επισήμανση από τον πίνακα 4.3 είναι πως το SW-D-P3 αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του SW-D (65-85%) ανεξάρτητα από τη δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 4. 3 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους ORAC-FL, FRAP, P-FRAP και ABTS για το τυρόγαλα, πριν (SW) και μετά την *in vitro* πέψη (SW-D και SW-D-P3), ανεξάρτητα από την προέλευση του γάλακτος

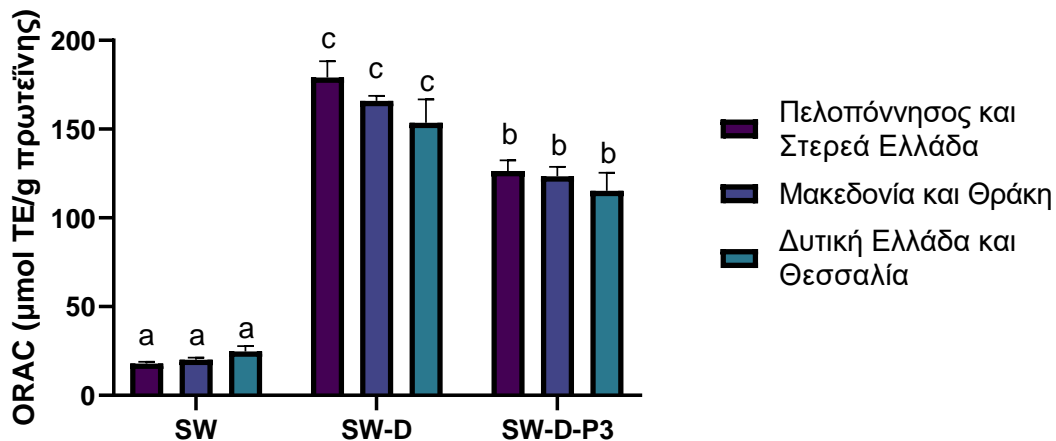
Μέθοδοι (μονάδες μέτρησης)	SW	SW-D	SW-D-P3
ORAC-FL ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	20,5±1,04 ^a	167,17±4,77 ^c	122,32±3,92 ^b
FRAP ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	10,89±0,50 ^a	31,44±1,28 ^c	21,32±0,59 ^b
P-FRAP ($\mu\text{mol BHT eqv/g protein}$)	7,51±0,31 ^a	26,9±0,75 ^c	18,73±0,56 ^b
ABTS ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	20,29±0,77 ^a	46,21±0,77 ^c	38,65±0,61 ^b

*Τα διαφορετικά γράμματα ανά γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$), ενώ τα ίδια γράμματα ανά στήλη δείχνουν μη σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$)

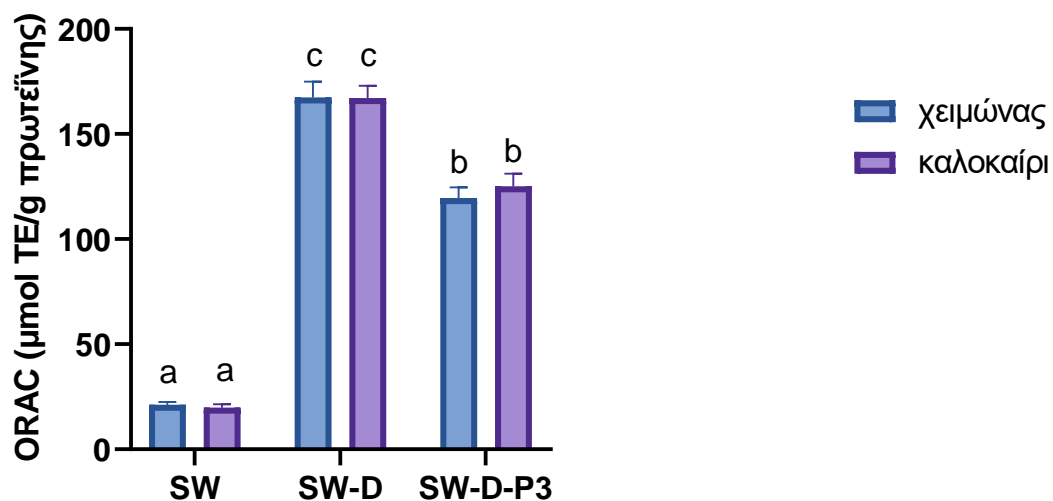
Στα διαγράμματα 4.28-4.39 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του τυρογάλακτος με τις μεθόδους ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS πριν και μετά την *in vitro* πέψη. Στο διάγραμμα 4.28, στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$) σημειώθηκε στα δείγματα πριν την πέψη, με το αγελαδινό SW να έχει υψηλότερες τιμές ORAC ($26,04 \pm 1,38 \mu\text{mol TE/g πρωτεΐνης}$) σε σχέση με τα υπόλοιπα SW (αίγιο, πρόβειο και αιγοπρόβειο). Αυτές οι διαφορές δεν εντοπίστηκαν μετά την πέψη και καμία σημαντική διαφορά δεν υπήρχε τόσο για τα SW-D όσο για τα SW-D-P3 με τη μέθοδο ORAC. Δεν σημειώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά που να αφορά τη γεωγραφική προέλευση (Διάγραμμα 4.29) και την εποχικότητα (Διάγραμμα 4.30) για το τυρόγαλα με τη μέθοδο ORAC.



Διάγραμμα 4.28 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol TE/g πρωτεΐνης}$ και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-e) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



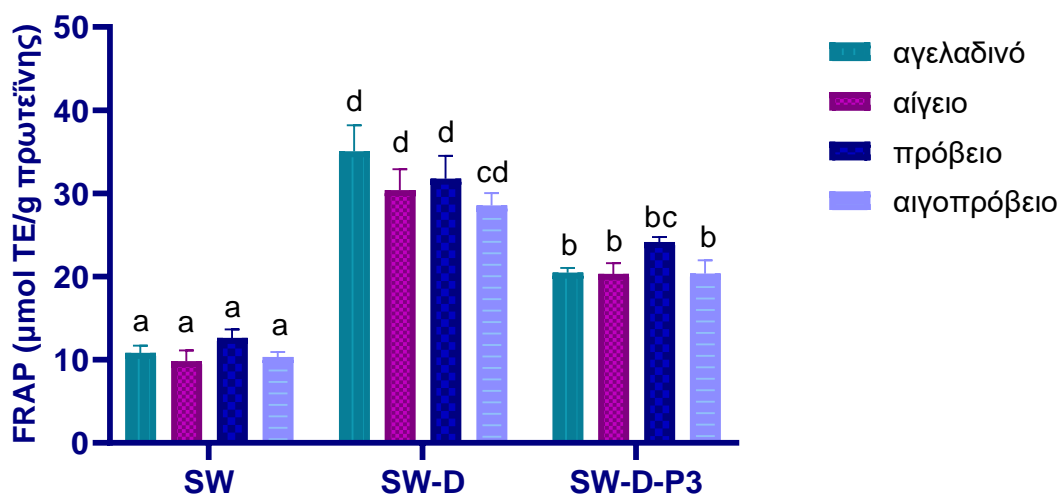
Διάγραμμα 4.29 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



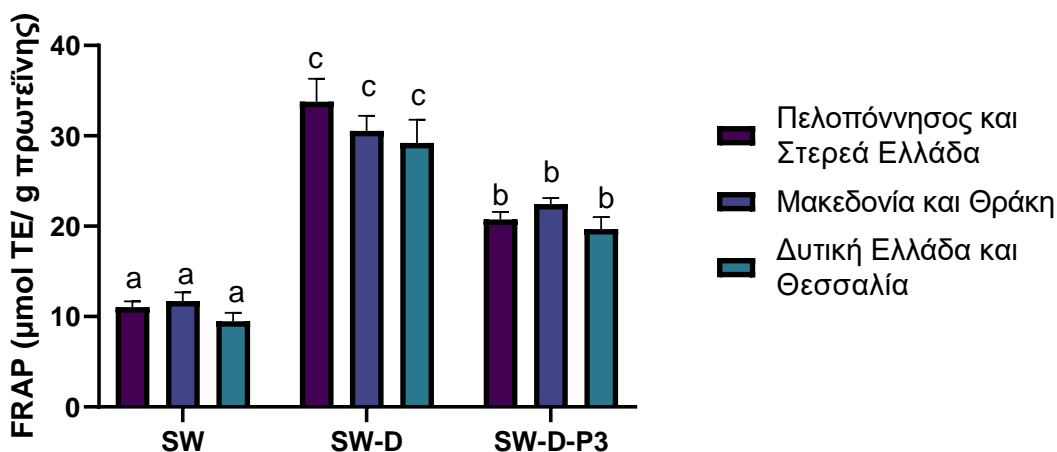
Διάγραμμα 4.30 Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στα διαγράμματα 4.31, 4.32, 4.33 αντίστοιχα, παρατηρείται πως τόσο μεταξύ των ειδών του τυρογάλακτος (αγελαδινό, αίγιο, πρόβιο, αιγοπρόβιο), όσο και της γεωγραφικής προέλευσης (Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα, Μακεδονία και Θράκη, Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία) και της εποχικότητας (χειμερινά, καλοκαιρινά), δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά που να αφορά την

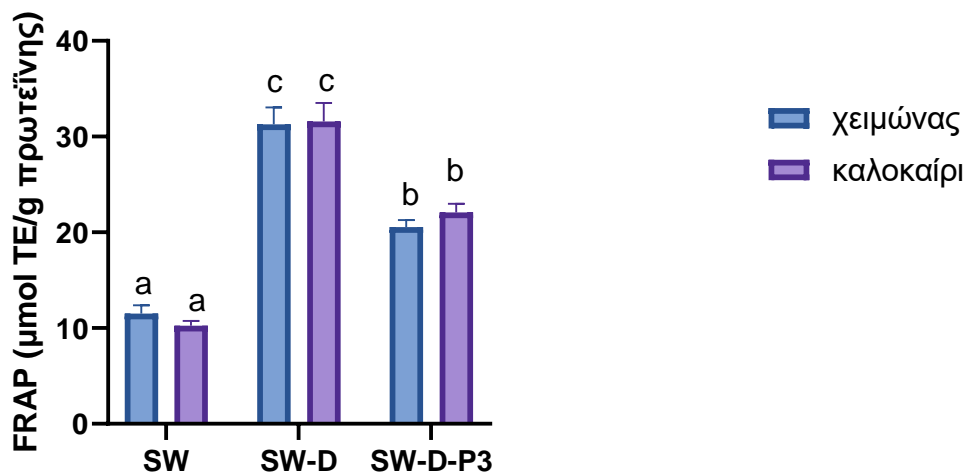
αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο FRAP. Ομοίως, για τη μέθοδο P-FRAP, που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στα διαγράμματα 4.34,4.35 και 4.36 αντιστοίχως.



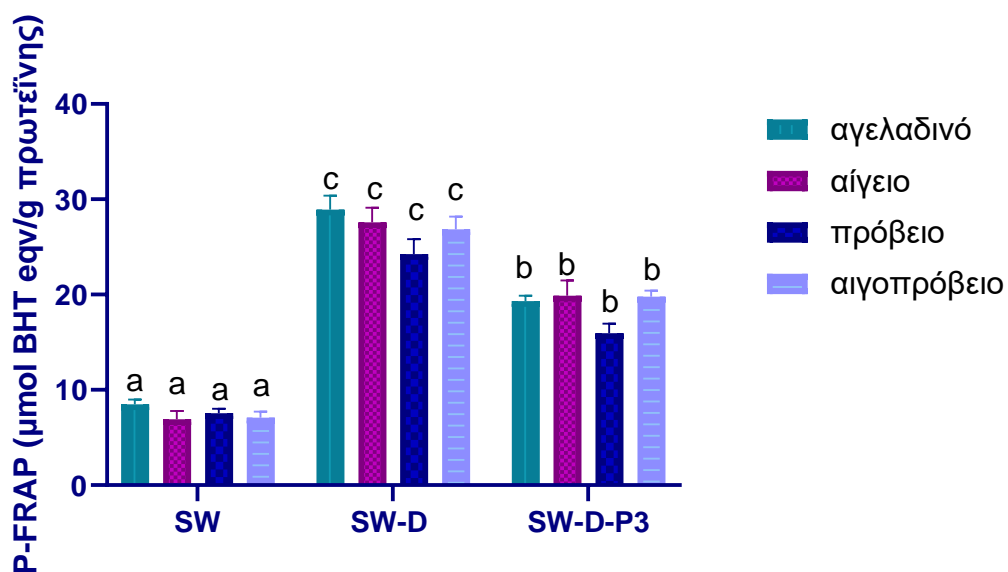
Διάγραμμα 4.31 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



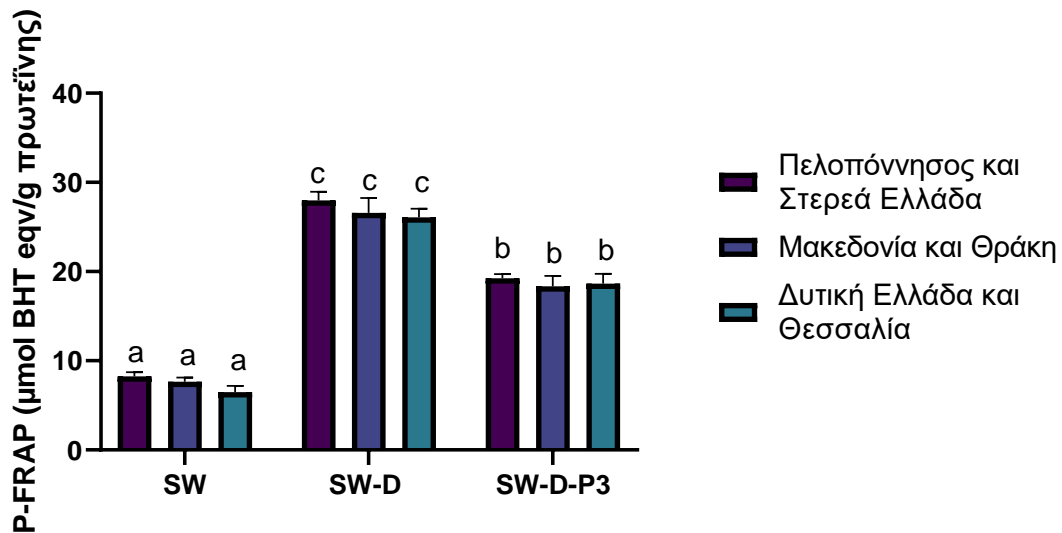
Διάγραμμα 4.32 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



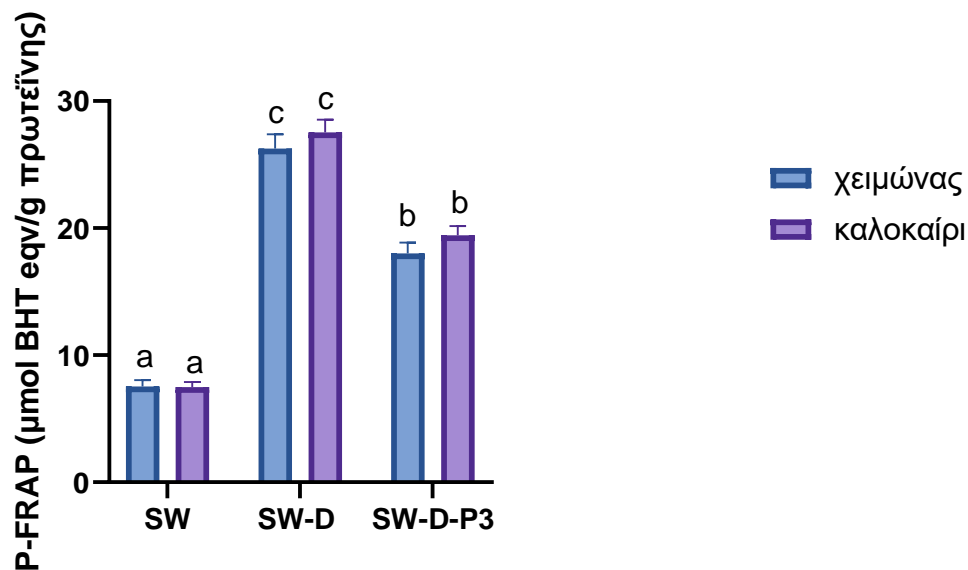
Διάγραμμα 4.33 Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο FRAP, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.34 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol BHT eqn/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



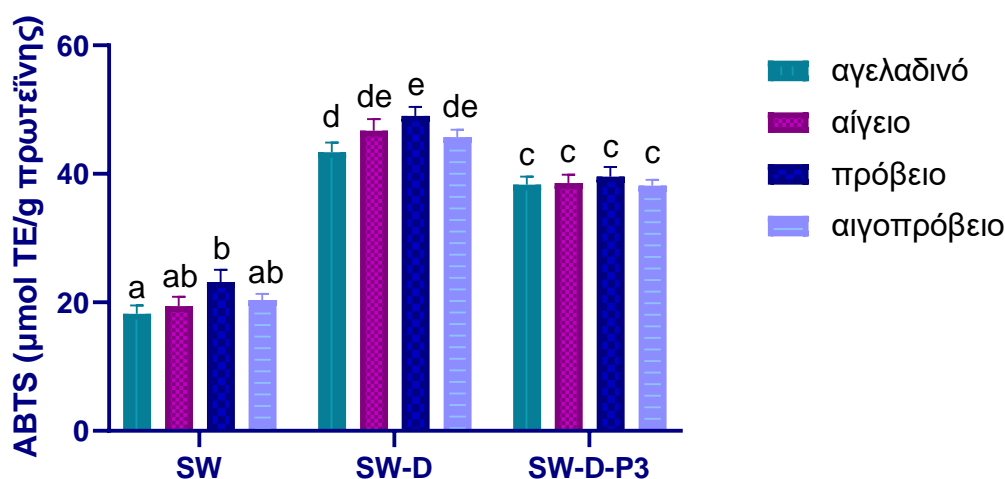
Διάγραμμα 4.35 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol BHT eqn/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



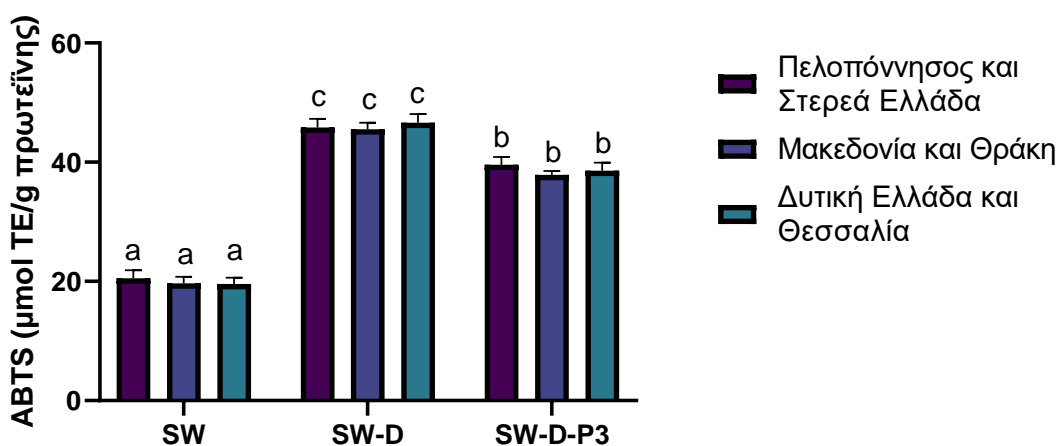
Διάγραμμα 4.36 Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ORAC-FL, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol BHT eqn/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στο διάγραμμα 4.37, στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$) σημειώθηκε στα δείγματα πριν την πέψη, με το πρόβειο SW να φέρει υψηλότερες τιμές ($23,18 \pm 1,90$

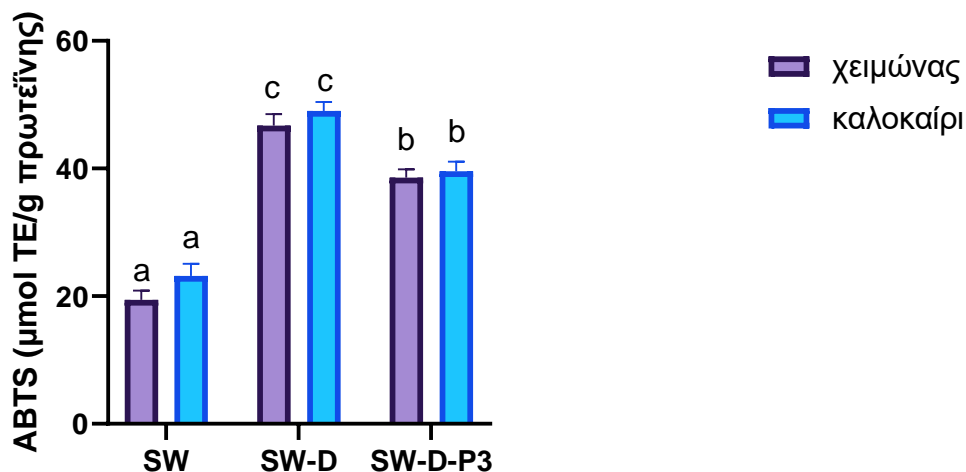
μmol TE/g πρωτεΐνης) σε σχέση με το αγελαδινό SW (18,24 ±1,26 μmol TE/g πρωτεΐνης) με τη μέθοδο ABTS. Αυτές οι διαφορές εντοπίστηκαν και μετά την πέψη για το κλάσμα SW-D, με το πρόβειο να έχει στατιστικώς υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το αγελαδινό τυρόγαλα. Καμία σημαντική διαφορά για τα SW-D-P3 δε σημειώθηκε ούτε με τη μέθοδο ABTS. Τέλος, δεν υπήρχε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά που να αφορά τη γεωγραφική προέλευση (Διάγραμμα 4.38) και την εποχικότητα (Διάγραμμα 4.37) για τα δείγματα SW με τη μέθοδο ABTS.



Διάγραμμα 4.37 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-e) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



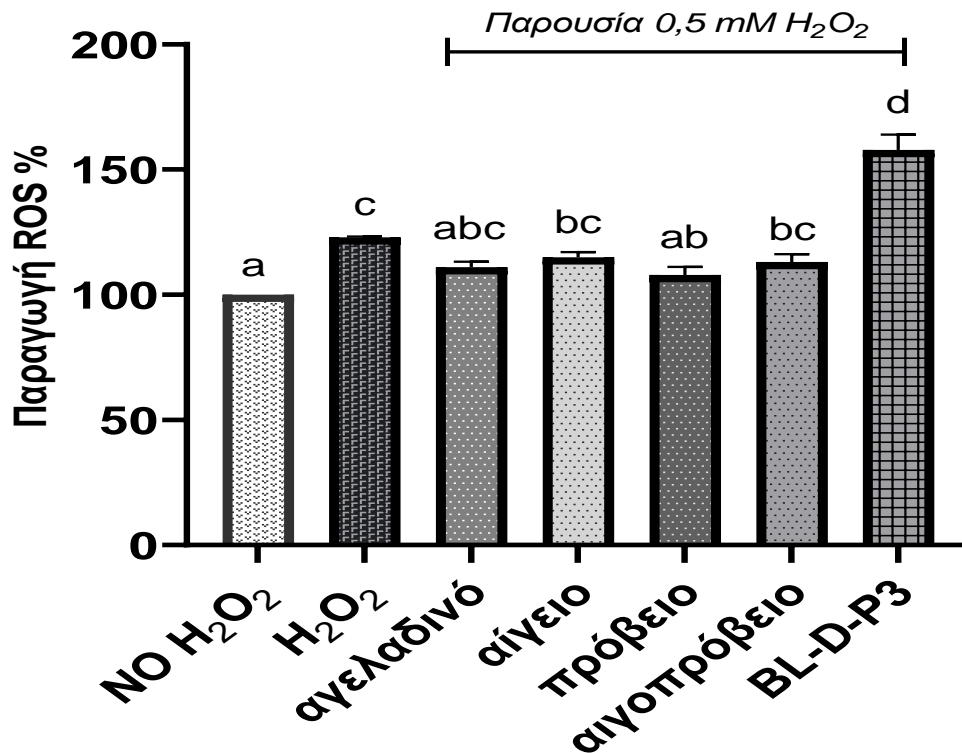
Διάγραμμα 4.38 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.39 Επίδραση της εποχικότητας του τυρογάλακτος με τη μέθοδο ABTS, πριν (SW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (SW-D, SW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

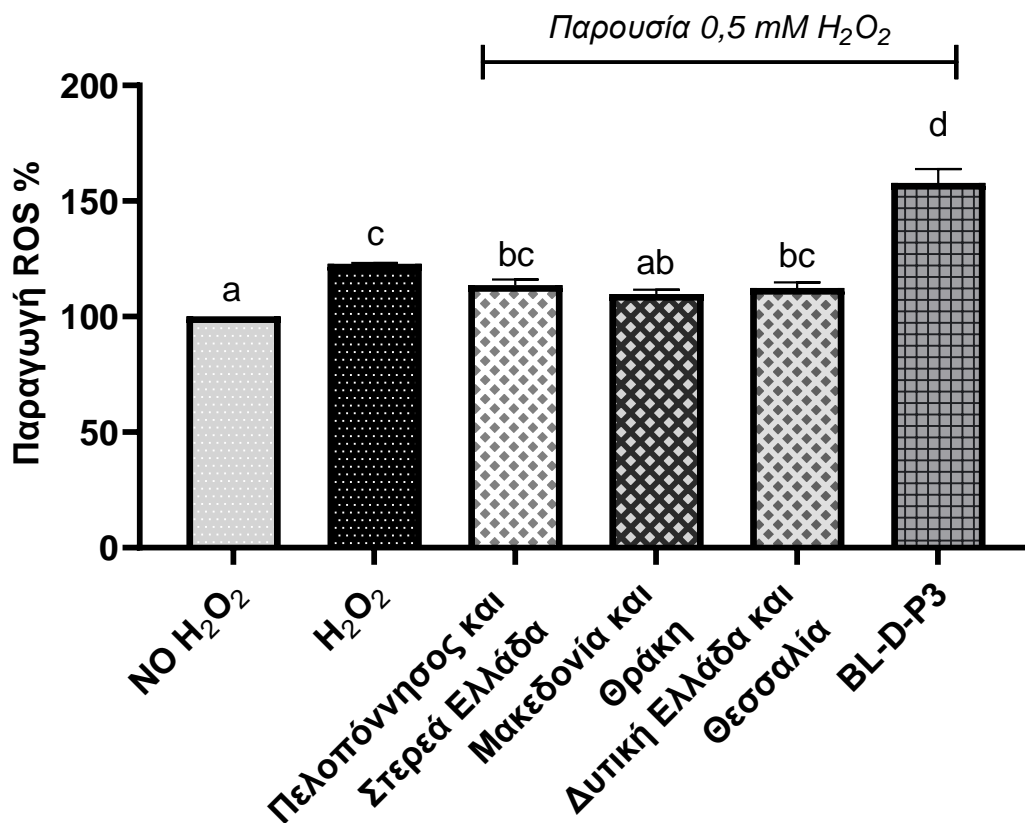
4.3.1.2 Κυτταρική αντιοξειδωτική δράση για SW-D-P3

Στα διαγράμματα 4.40-4.42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης του τυρογάλακτος (6 mg πρωτεΐνης/ml; SW-D-P3) σε επίπεδο κυττάρου (HT-29) υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (H_2O_2 ως οξειδωτικός παράγοντας). Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 4.40 παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της αναστολής % των ROS για το SW-D-P3 ($p \leq 0,05$), ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης του τυρογάλακτος, σε σύγκριση με το BL-D-P3. Επίσης, σημειώθηκε πως η έκθεση των κυττάρων στο πρόβειο SW-D-P3 περιόρισε σημαντικά ($p \leq 0,05$) την παραγωγή % των ROS σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε H_2O_2 , μείωση ελεύθερων ριζών κατά 15%.



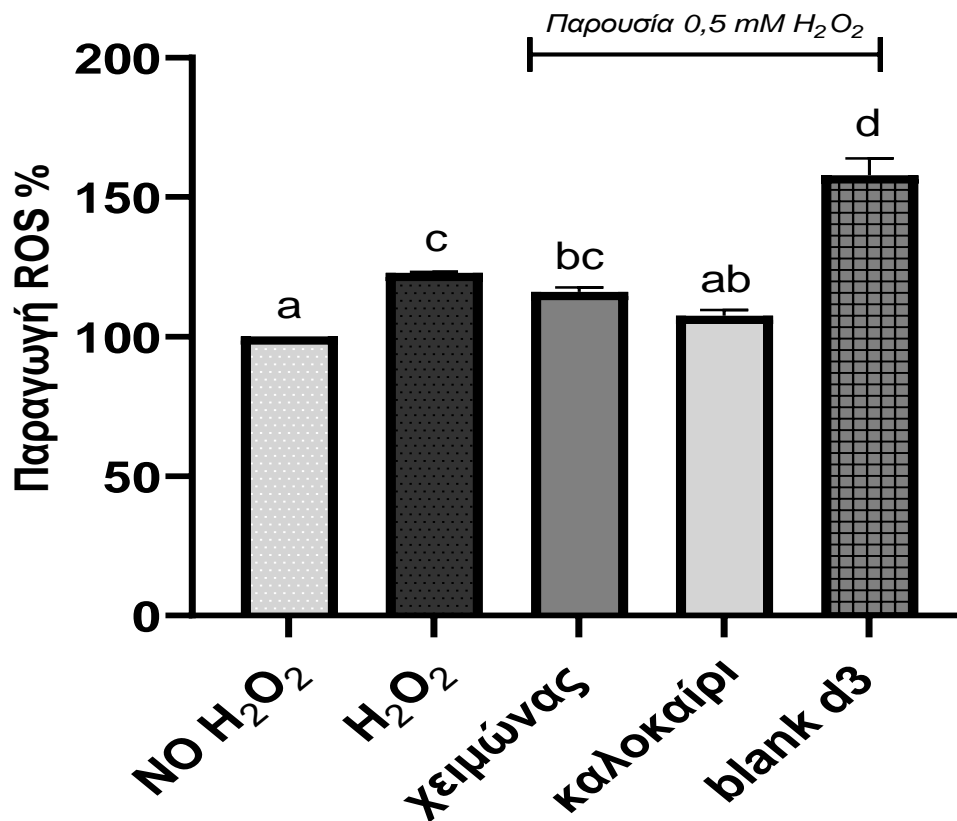
Διάγραμμα 4.40 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), αγελαδινό, αίγιο, πρόβειο και αιγοπρόβειο=SW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στο διάγραμμα 4.41 παρατηρείται πως η γεωγραφική προέλευση του SW-D-P3 έδωσε μειωμένα επίπεδα ROS% σε σύγκριση με το BL-D-P3. Όμως, τα HT-29 που εκτέθηκαν στα δείγματα SW-D-P3 με προέλευση από την Μακεδονία και τη Θράκη, η παραγωγή των ROS ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη ($p \leq 0,05$) σε σχέση με το μάρτυρα, δηλαδή τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε H₂O₂ κατά 13%.



Διάγραμμα 4.41 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα, Μακεδονία και Θράκη, Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία=SW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στο διάγραμμα 4.42 παρατηρείται η επίδραση της εποχικότητας των SW-D-P3 στην αντιοξειδωτική ικανότητα σε επίπεδο κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, υπό οξειδωτικές συνθήκες, παρατηρήθηκε αναστολή των ROS% στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε SW-D-P3, είτε καλοκαιρινά είτε χειμερινά, σε σύγκριση με τα BL-D-P3. Ωστόσο, η μείωση παραγωγής των ROS% παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη ($p \leq 0,05$) για τα καλοκαιρινά SW-D-P3 σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά 16%.



Διάγραμμα 4.42 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (SW-D-P3) σε συγκέντρωση 6 mg πρωτεΐνης/mL τυρογάλακτος με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), χειμώνας, καλοκαίρι=SW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

4.3.2 Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης για τον όξινο ορό γιαούρτης

4.3.2.1 Βιοχημικές μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης ΟΟΓ

Στον πίνακα 4.4 αποτυπώνεται μία συνολική εικόνα της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων πριν (AW) και μετά (AW-D και AW-D-P3) την *in vitro* γαστρεντερική πέψη με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους (ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS). Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ΟΟΓ μετά τη διαδικασία της γαστρεντερικής πέψης με όλες τις βιοχημικές μεθόδους και ανεξαρτήτως προέλευσης του γάλακτος (αγελαδινό, αίγιο, πρόβιο). Η διαδικασία της πέψης είχε θετική επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων του ΟΟΓ, σημειώνοντας 2-4 φορές αύξηση για τις μεθόδους FRAP, P-FRAP και ABTS. Σημειώθηκε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων AW-D με τη μέθοδο ORAC, παρατηρώντας κατά προσέγγιση 13 φορές αύξηση σε σχέση με τα δείγματα AW. Τέλος, στον πίνακα 4.4 φαίνεται πως το AW-D-P3 αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του AW-D (60-90 %) ανεξαρτήτως της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

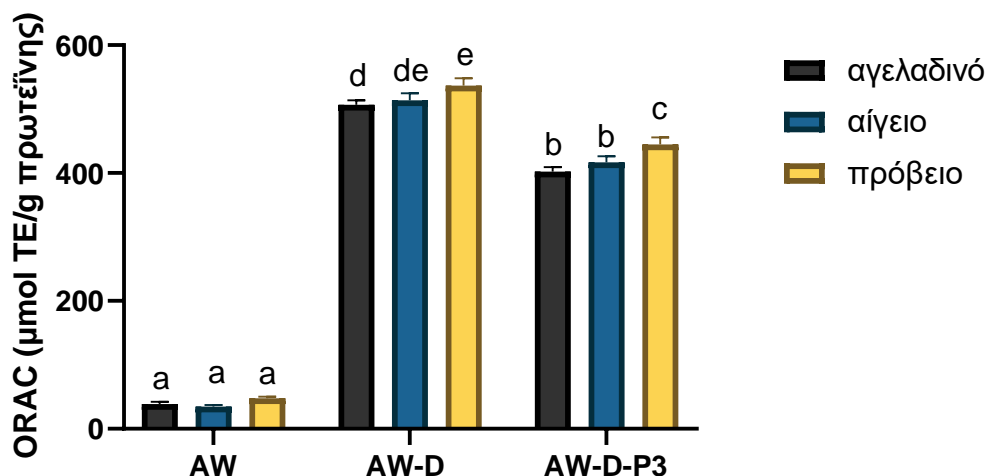
Πίνακας 4.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τις μεθόδους ORAC-FL, FRAP, P-FRAP και ABTS για τον ΟΟΓ, πριν (AW) και μετά την *in vitro* πέψη (AW-D και AW-D-P3), ανεξάρτητα από την προέλευση του γάλακτος

Μέθοδοι (μονάδες μέτρησης)	AW	AW-D	AW-D-P3
ORAC-FL ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	39,94 \pm 1,91 ^a	514,79 \pm 5,34 ^C	418,06 \pm 5,20 ^b
FRAP ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	21,63 \pm 2 ^a	52,25 \pm 2,94 ^C	46,13 \pm 2,53 ^b
P-FRAP ($\mu\text{mol BHA eqv/g protein}$)	5,82 \pm 0,44 ^a	25,23 \pm 1,62 ^C	15,72 \pm 1,05 ^b
ABTS ($\mu\text{mol TE/g protein}$)	9,19 \pm 0,7 ^a	26,53 \pm 0,33 ^C	19,64 \pm 0,32 ^b

*Τα διαφορετικά γράμματα ανά γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$), ενώ τα ίδια γράμματα ανά στήλη δείχνουν μη σημαντική διαφορά ($p \geq 0.05$)

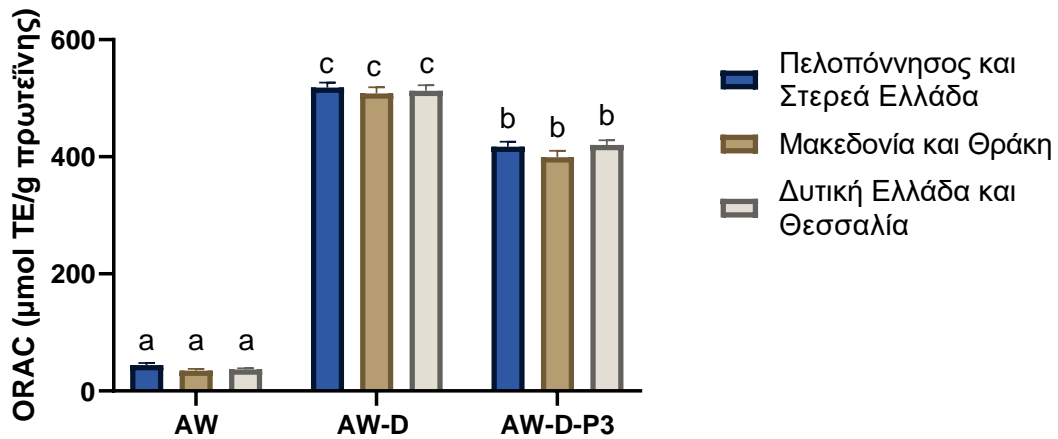
Στα διαγράμματα 4.43-4.54 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ΟΟΓ με τις μεθόδους ORAC, FRAP, P-FRAP και ABTS πριν και μετά την *in vitro* πέψη. Στο διάγραμμα 4.43 παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μετά την *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης που υπέστησαν τα δείγματα του AW, με υψηλότερες τιμές ORAC να έχουν τα δείγματα AW που προήλθαν από πρόβιο γάλα. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές ORAC για AW-D για δείγματα πρόβειας προέλευσης

(536,81±11,65 $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης) να είναι υψηλότερες σημαντικά ($p \leq 0,05$) από αυτές του αγελαδινού (506,51±7,41 $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης). Επίσης, για το κλάσμα AW-D-P3 αποτυπώθηκαν στατιστικά υψηλότερες τιμές για τα AW πρόβειας προέλευσης ($p \leq 0,05$) σε σύγκριση με τα AW αγελαδινής και αίγειας προέλευσης.

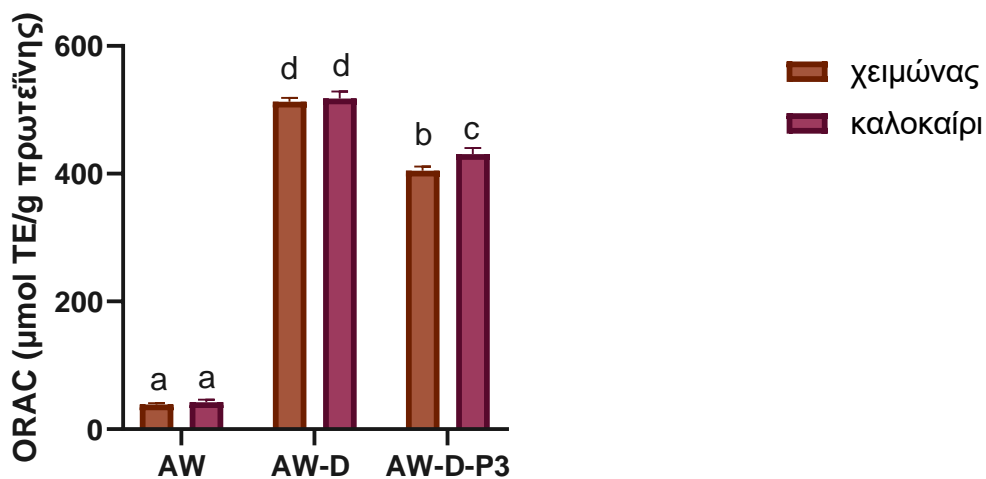


Διάγραμμα 4.43 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-e) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στο διάγραμμα 4.44 δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά που να αφορά τη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων ΟΟΓ τόσο πριν όσο και μετά την *in vitro* γαστρεντερική πέψη με την αντιοξειδωτική μέθοδο ORAC. Σε αντίθεση, στο επόμενο διάγραμμα 4.45 που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βάσει της εποχικότητας συλλογής των δειγμάτων, φάνηκε να υπάρχει αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα για τα καλοκαιρινά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η αύξηση έλαβε χώρα για το κλάσμα AW-D-P3, με τις τιμές ORAC για τα καλοκαιρινά να εμφανίζονται στατιστικά μεγαλύτερες από αυτές των χειμερινών δειγμάτων (430,88±9,26 $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης και 404,89±6,15 $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης, αντίστοιχα).



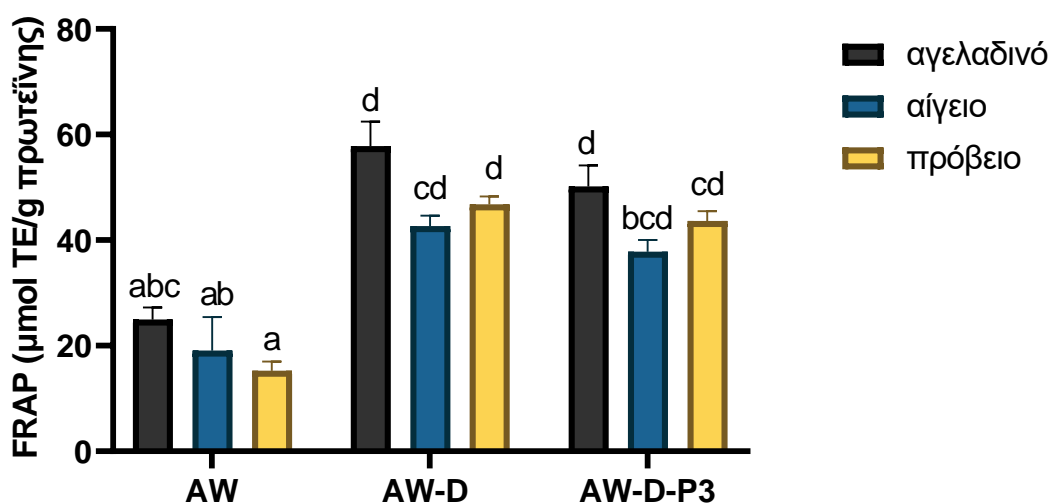
Διάγραμμα 4.44 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



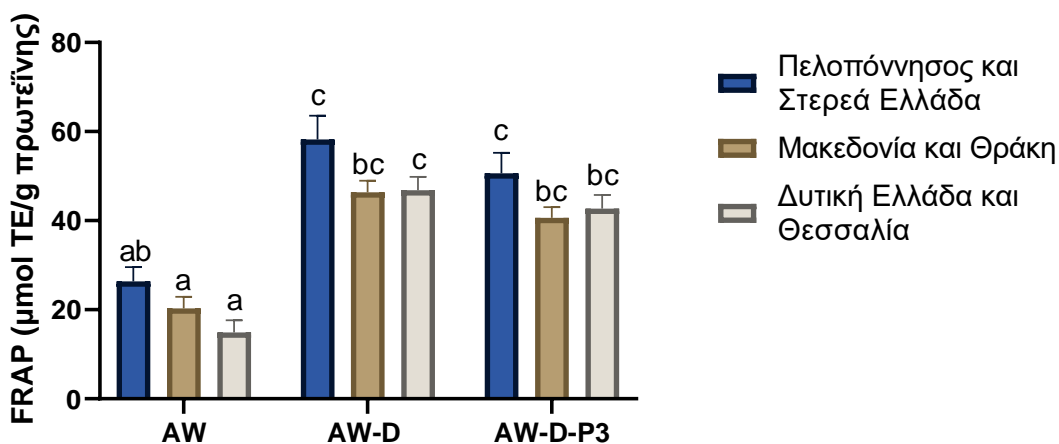
Διάγραμμα 4.45 Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο ORAC, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στα διαγράμματα 4.46-4.48 παρατηρείται πως τόσο μεταξύ των ειδών του ΟΟΓ (αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο), όσο και της γεωγραφικής προέλευσης (Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα, Μακεδονία και Θράκη, Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία) και της

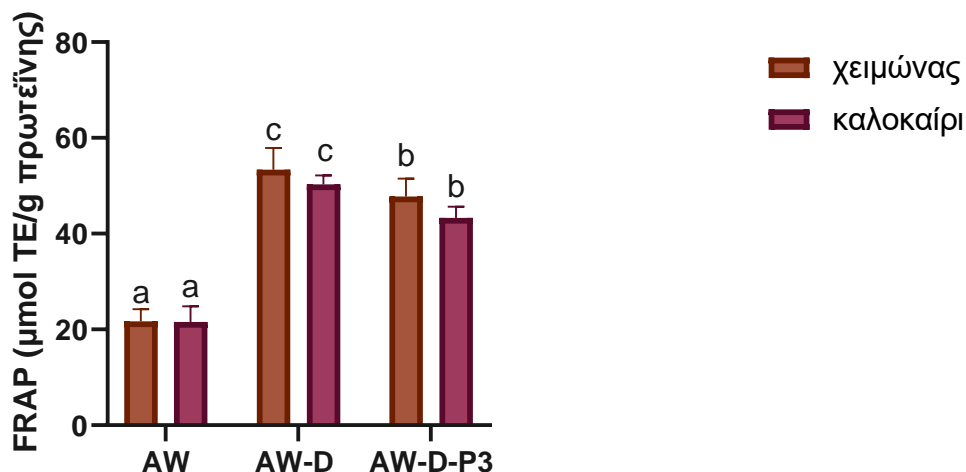
εποχικότητας (χειμερινά, καλοκαιρινά), δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά που να αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο FRAP.



Διάγραμμα 4.46 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος ± SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

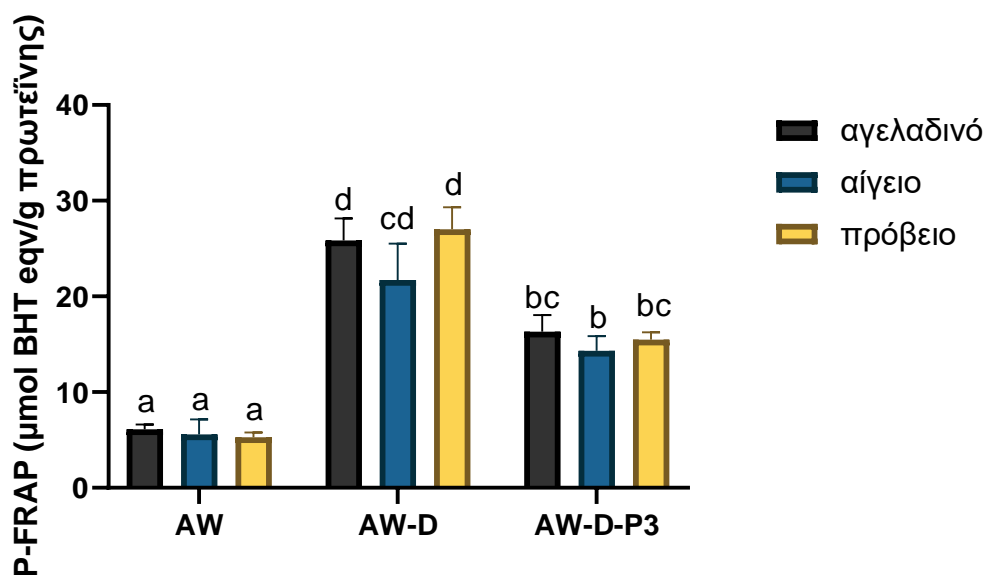


Διάγραμμα 4.47 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος ± SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

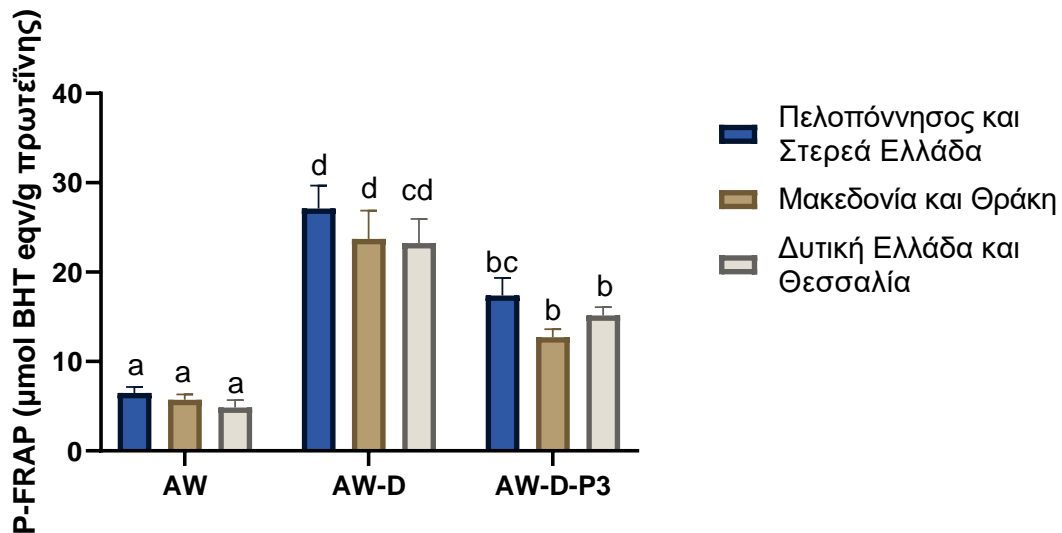


Διάγραμμα 4.48 Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

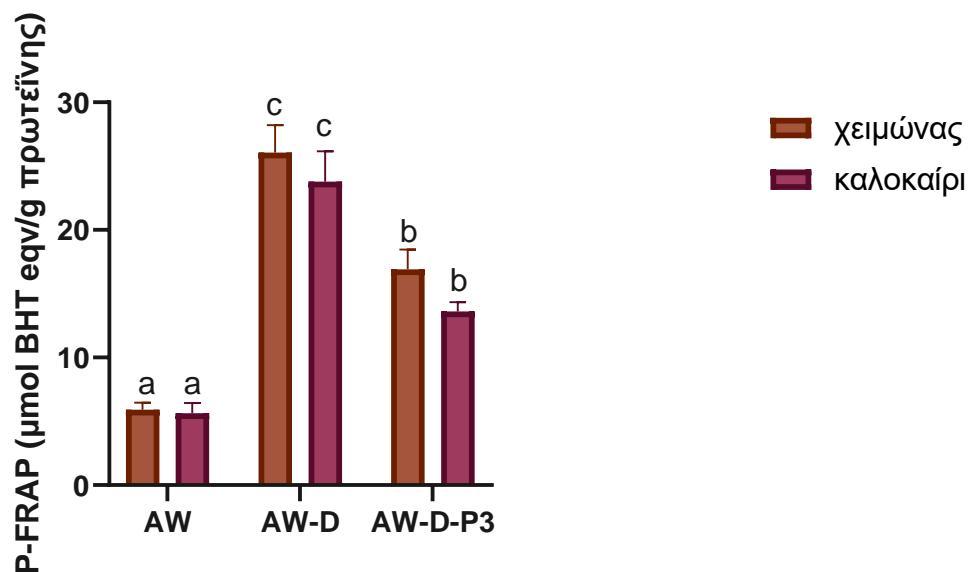
Ομοίως, για τη μέθοδο P-FRAP, που παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στα διαγράμματα 4.49-4.51, αντιστοίχως. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν υπήρξε για τα κλάσματα πριν (AW) και μετά την *in vitro* πέψη (AW-D και AW-D-P3) βάσει ζωικής και γεωγραφικής προέλευσης και εποχικότητας.



Διάγραμμα 4.49 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol BHT eqn/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



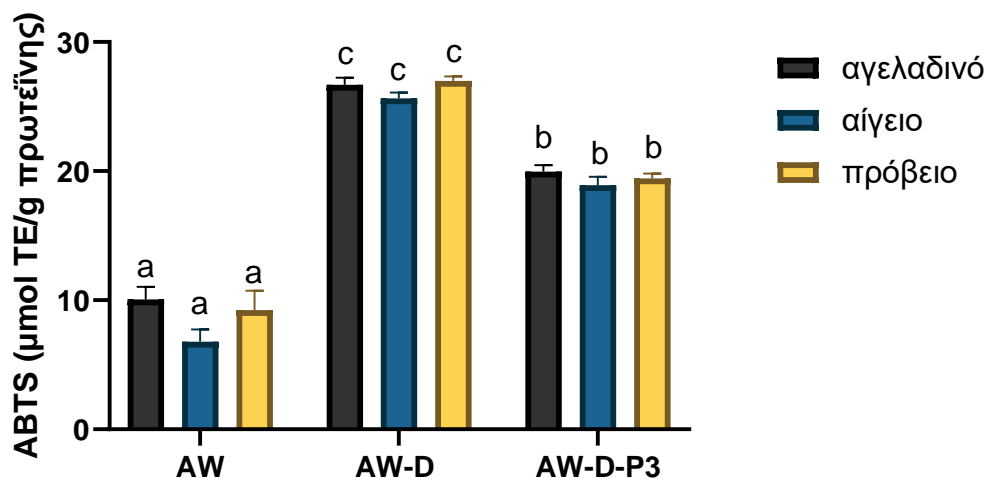
Διάγραμμα 4.50 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol BHT eq/g πρωτεΐνης}$ και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



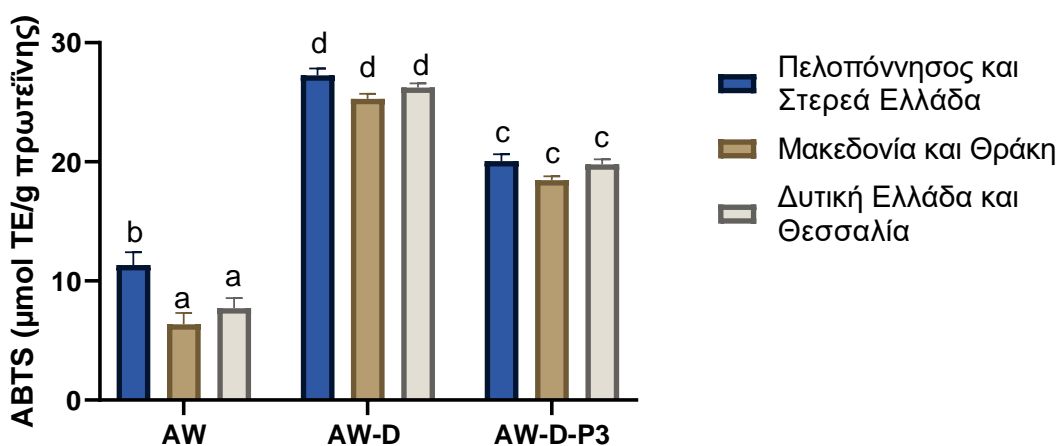
Διάγραμμα 4.51 Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο P-FRAP, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol BHT eq/g πρωτεΐνης}$ και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Τέλος, στα διαγράμματα 4.52-4.54 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS για τα δείγματα του ΟΟΓ. Πιο αναλυτικά, καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρουσιάστηκε ανάμεσα στα

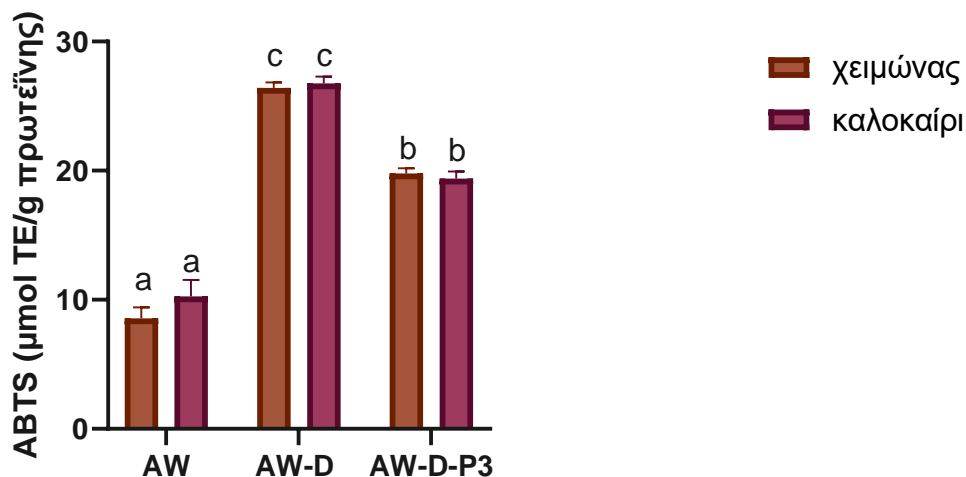
κλάσματα AW, AW-D P3 όσον αφορά τη ζωική προέλευση (διάγραμμα 4.52) και την εποχικότητα (διάγραμμα 4.53). Στο διάγραμμα 4.54, στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ($p \leq 0,05$) αντιοξειδωτικής ικανότητας για τα δείγματα ΟΟΓ πριν την πέψη που συλλέχθηκαν από τις Περιφέρειες Πελοποννήσου και Στερεάς Ελλάδας παρατηρήθηκαν σε σχέση με τις άλλα δύο γεωγραφικά διαμερίσματα.



Διάγραμμα 4.52 Επίδραση της ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



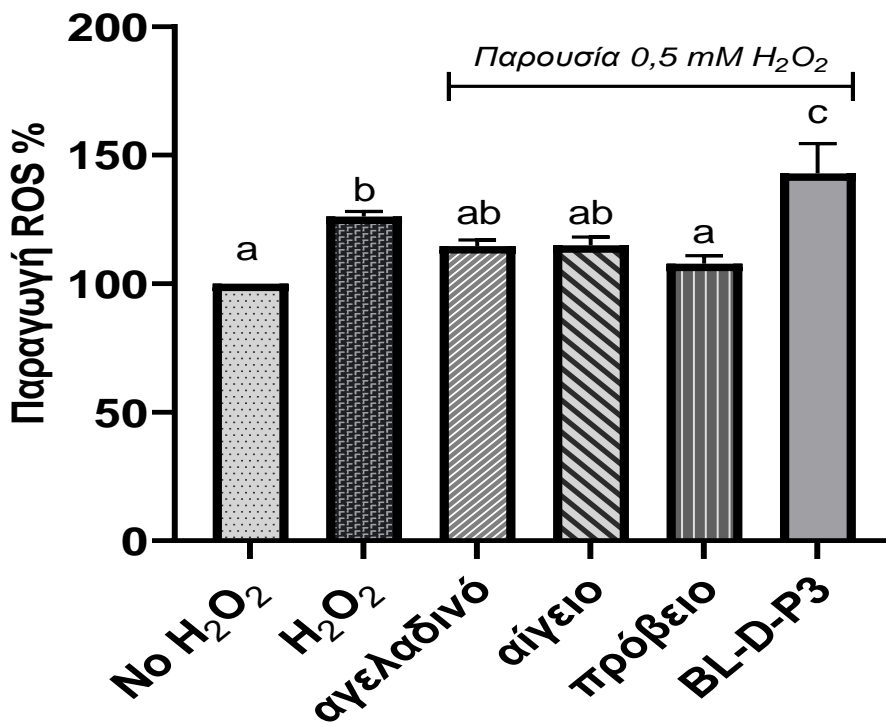
Διάγραμμα 4.53 Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μmol TE/g πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-d) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.



Διάγραμμα 4.54 Επίδραση της εποχικότητας του ΟΟΓ με τη μέθοδο ABTS, πριν (AW) και μετά την *in vitro* προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης (AW-D, AW-D-P3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\mu\text{mol TE/g}$ πρωτεΐνης και αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a,b,c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

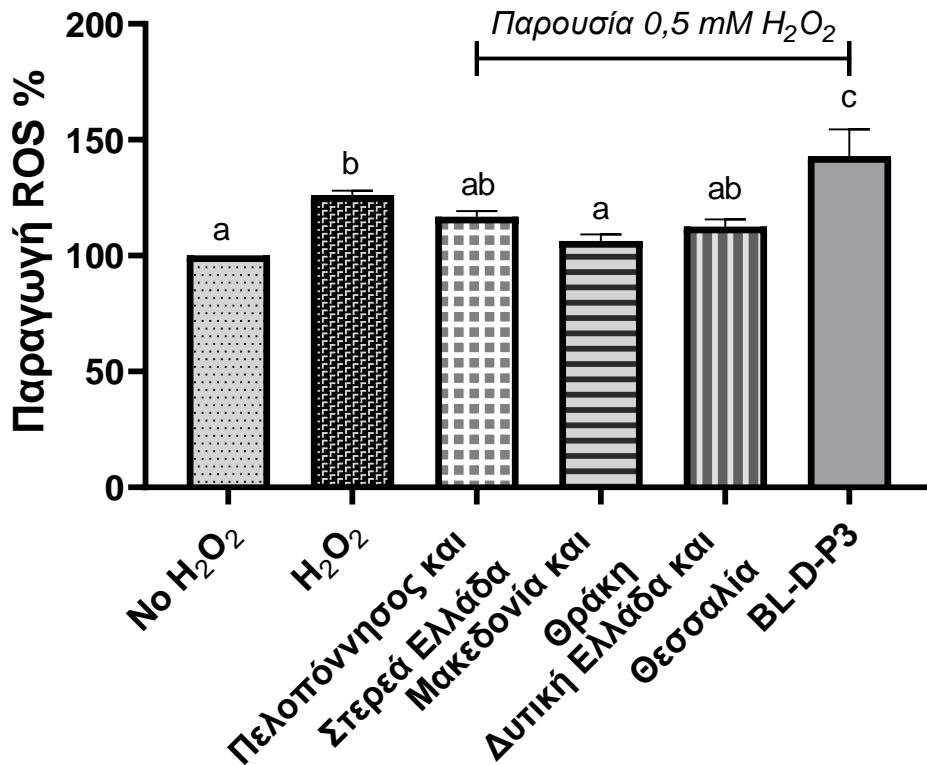
4.3.2.2 Κυτταρική αντιοξειδωτική δράση για AW-D-P3

Στα διαγράμματα 4.55 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ΟΟΓ (2 mg πρωτεΐνης/ml; AW-D-P3) σε κυτταρικό επίπεδο (HT-29) υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (H_2O_2 ως οξειδωτικός παράγοντας). Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 4.55 παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της παραγωγής % των ROS για το AW-D-P3 ($p \leq 0,05$), ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης του ΟΟΓ, σε σύγκριση με το BL-D-P3. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p \leq 0,05$) της παραγωγής των ROS% στα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στο πρόβειο AW-D-P3 και H_2O_2 , σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε H_2O_2 , μείωση ελεύθερων ριζών που αποτυπώθηκε να είναι 19%.



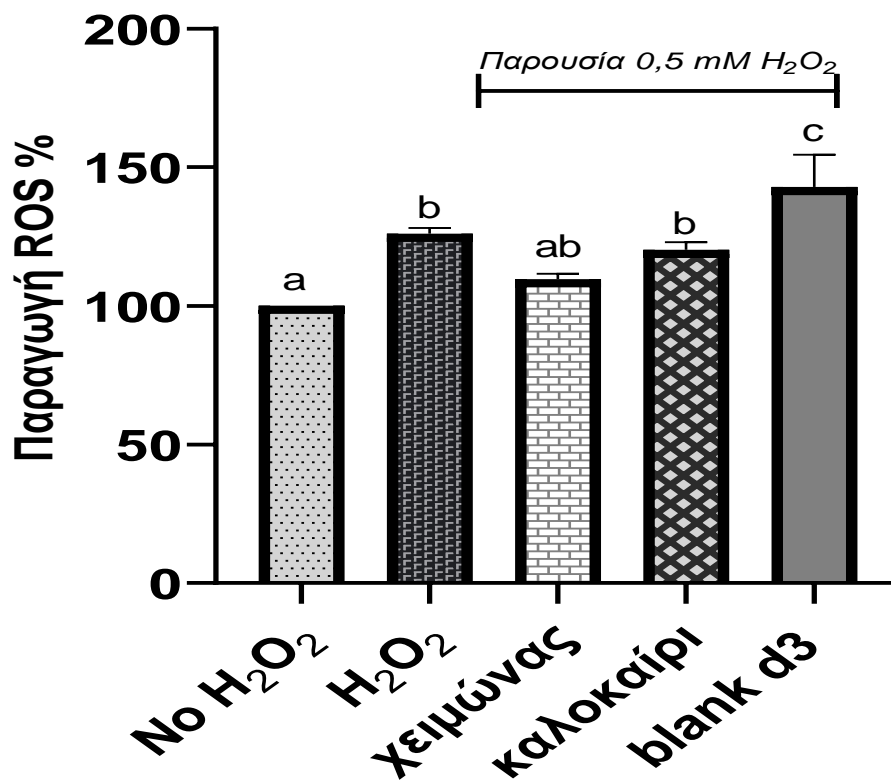
Διάγραμμα 4.55 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), αγελαδινό, αίγιο, πρόβιο=AW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Στο διάγραμμα 4.56 αποτυπώνεται η επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης των AW-D-P3 στην αντιοξειδωτική ικανότητα στα κύτταρα HT-29 υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Στατιστικώς σημαντική μείωση παραγωγής των ROS% ($p \leq 0,05$) παρατηρήθηκε για τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε AW-D-P3, ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης, σε σύγκριση με τα BL-D-P3. Όμως, στατιστικώς σημαντική αναστολή των ROS%, κατά 20%, σημειώθηκε μόνο για τα AW-D-P3 με προέλευση τη Μακεδονία και τη Θράκη, σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Διάγραμμα 4.56 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), Πελοπόννησος και Στερεά Ελλάδα, Μακεδονία και Θράκη, Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία=AW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος±SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

Τέλος, στο διάγραμμα 4.57 παρουσιάζεται η επίδραση της εποχικότητας των AW-D-P3 στην αντιοξειδωτική ικανότητα σε επίπεδο κυττάρου. Παρατηρήθηκε πως τόσο τα καλοκαιρινά όσο και τα χειμερινά AW-D-P3 είχαν στατιστικώς σημαντική μείωση παραγωγής των ROS% σε σχέση με τα BL-D-P3. Σε αντίθεση, καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ AW-D-P3 σε σύγκριση με το μάρτυρα, σημειώνοντας τάση μείωση παραγωγής των ROS%.



Διάγραμμα 4.57 Παραγωγή % δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε HT-29 κύτταρα (επίστρωση 5×10^4 κύτταρα/κελί) μετά από έκθεση 24 ωρών με το κλάσμα του προϊόντος πέψης με πεπτίδια μικρότερα των 3kDa (AW-D-P3) σε συγκέντρωση 2 mg πρωτεΐνης/mL ΟΟΓ με ταυτόχρονη παρουσία 0,5 mM H₂O₂ (παράγοντας οξειδωτικού στρες). NO H₂O₂=τυφλό (κύτταρα χωρίς παρουσία H₂O₂; blank), H₂O₂=μάρτυρας (κύτταρα μόνο με παρουσία H₂O₂; control), χειμώνας, καλοκαίρι=AW-D-P3 παρουσία H₂O₂ και BL-D-P3=τυφλό (πέψη χωρίς τρόφιμο) παρουσία H₂O₂. Οι τιμές αποτυπώνονται ως μέσος όρος \pm SEM και οι στήλες με διαφορετικούς εκθέτες (a-c) υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο $p \leq 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ερευνητική κοινότητα έχει στραφεί στη βαθύτερη διερεύνηση των ιδιοτήτων των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων και των βιοενεργών συστατικών αυτών, καθώς σε παγκόσμιο επίπεδο η παραγωγή των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων αυξάνεται κατά 2%, με την ετήσια παραγωγή των υποπροϊόντων να υπερβαίνει τα 190 εκατομμύρια τόνους (Papademas and Kotsaki, 2019). Παράλληλα, οι καταναλωτές δείχνουν αυξανόμενη ευαισθητοποίηση για τα οφέλη των τροφίμων στην υγεία καθώς και την ισορροπία της ανθρώπινης υγείας, της διατροφής και του περιβάλλοντος. Επίσης, η ισορροπημένη προσέγγιση τόσο της οικονομικής, της περιβαλλοντικής καθώς και της κοινωνικής ευθύνης, χαρακτηρίζουν στις μέρες μας τη βιώσιμη επιχείρηση, που εν προκειμένω είναι ο κλάδος της γαλακτοβιομηχανίας (Arshad *et al.*, 2023).

Η περιεκτικότητα σε WP είναι από τα βασικά πλεονεκτήματα των υπό μελέτη γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, τυρογάλακτος και ΟΟΓ. Οι πρωτεΐνες ανήκουν στα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων που μπορούν να υδρολυθούν κατά τη γαστρεντερική πέψη σε ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων και η σημασία των πεπτιδίων αυτών συνδέεται με τις λειτουργικές τους ιδιότητες (León-López *et al.*, 2022). Ενώ τα πεπτίδια αυτά είναι ανενεργά μέσα στη μητρική πρωτεΐνη, μπορούν να ελευθερωθούν και να ενεργοποιηθούν κατά την ενζυμική πέψη *in vivo* ή *in vitro*. Έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου όταν απελευθερώνονται από την πρωταρχική δομή (Solieri *et al.*, 2022). Πληθώρα μελετών, *in vivo* και *in vitro*, έχουν αναφερθεί στη θετική επίδραση των βιοενεργών πεπτιδίων από WP στην υγεία του ανθρώπου (Marcone, Belton and Fitzgerald, 2017).

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η ανοσορυθμιστική δράση του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ μετά από *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερικής πέψης (Brodkorb *et al.*, 2019) και έκθεσης των προϊόντων πέψης SW-D-P3 και AW-D-P3 αντιστοιχώς, τόσο σε μακροφάγα όσο και σε διεγερμένα με LPS μακροφάγα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς THP-1 και σε διεγερμένα με LPS μακροφάγα της RAW 264.7 κυτταρικής σειράς μύς. Οι δύο αυτές καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως *in vitro* μοντέλα μακροφάγων για τη μελέτη των ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων που προσδίδουν τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα και των επιμέρους συστατικών τους (Kiewiet *et al.*, 2018b; Corrochano *et al.*, 2019; Rafiee Tari, Arranz and Corredig, 2019). Επίσης, πεπτίδια του ορού του γάλακτος

απελευθερώνονται κατά την πέψη και ασκούν ανοσορυθμιστική δράση ενισχύοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Ωστόσο, οι κυτταρικές λειτουργίες και οι μηχανισμοί αυτών που εμπλέκονται παραμένουν άγνωστα σε μεγάλο βαθμό (Cai *et al.*, 2021). Είναι γνωστό πως τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα στο σημείο της φλεγμονής, με πλήθος μορίων (ένζυμα, υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες) να συμμετέχουν που με τη σειρά τους πυροδοτούν την απελευθέρωση κυτοκινών στην κυκλοφορία του οργανισμού μέσω πολύπλοκων μονοπατιών σηματοδότησης (Grancieri, Martino and Gonzalez de Mejia, 2019). Τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται όταν το ερέθισμα, όπου στην παρούσα μελέτη είναι το LPS, συνδέεται με το σύμπλεγμα διαφοροποίησης 14 (cluster of differentiation 14; CD14) και τους TLRs (κυρίως τον TLR4) στην κυτταρική μεμβράνη. Μια πρώιμη απόκριση στο LPS, η οποία εξαρτάται από τον παράγοντα MyD88 και τον προσαρμογέα αυτού, οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB. Μια μεταγενέστερη απόκριση στο LPS ενεργοποιεί τον TRIF που επάγει τον προσαρμογέα που περιέχει τον TIR (TRIF) και το μόριο TRAM. Έπειτα, πραγματοποιείται η ενεργοποίηση και η μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα όπου και οδηγεί στην επαγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2004).

Το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει το LPS μέσω του TLRs, ο οποίος ενεργοποιεί τις αποκρίσεις άμυνας με ή χωρίς το μόριο MYD88 (κεφάλαιο 1.4.8) ως προσαρμογέα σηματοδότησης. Η διέγερση του TLR4 οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης NFκB μέσω MYD88, αυξάνοντας την μεταγραφική ικανότητα των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Προηγούμενες μελέτες έχουν παρουσιάσει αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την πιθανή επαγωγή της επιφανειακής έκφρασης των TLRs από LPS, με κάποιους συγγραφείς να αναφέρουν αύξηση ή μείωση της έκφρασης και άλλοι να μη βρίσκουν κάποια επίδραση των Toll-like υποδοχέων. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση μόνο για το πρόβειο AW-D-P3 σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα, ενώ ελάττωση των επιπέδων mRNA για *TLR2* και *TLR4* εντοπίστηκε στα μακροφάγα για όλα τα SW-D-P3 και για το πρόβειο SW-D-P3 αντίστοιχα. Η έκφραση των Toll-like υποδοχέων συνδέεται άρρηκτα με την ειδικότητα του ιστού και τη κυτταρικής σειράς που εξετάζεται καθώς και με τις διαφορές στις συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας που επικρατούν, όπως το ερέθισμα που χρησιμοποιείται, η συγκέντρωση και ο χρόνος επίδρασης του ερεθίσματος και του τροφίμου κ.α.

Σε μελέτη των Arbizu *et al.* διερευνήθηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι NFκB μέσω της γονιδιακής έκφρασης των *TLR4*, *IRAK1*, *NFκB* και *TNFA* σε κύτταρα εντερικού επιθηλίου. Σε κύτταρα HT29-MTX εκτέθηκε WPI (100 μg/mL) για 1 ώρα και ακολούθησαν 3 ώρες επώαση με LPS (4 μg/mL). Σε κανένα από τα γονίδια δε σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική αλλαγή σε σύγκριση με τα LPS κύτταρα. Σε αντίθεση, η έκθεση των ίδιων κυττάρων σε GMP παρουσίασε μειωμένα επίπεδα mRNA των *TLR4*, *IRAK1* και *NFκB*, υποστηρίζοντας πως το γλυκομακροπεπτίδιο επιδεικνύει προστατευτική δράση μέσω αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού (Arbizu *et al.*, 2020).

Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μπορεί να υποβληθούν σε πολύπλοκες διεργασίες που οδηγούν στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως είναι τα NO, MCP1, TNFA, IL1B και IL6 (Dinarello, 2000). Σε έρευνα των Sharif *et al.* προσδιορίστηκε το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης με qPCR σε THP-1 κύτταρα, ενεργοποιημένα με LPS για 1 και 4 ώρες, όπου παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα με τα μακροφάγα προερχόμενα από PBMCs ανθρώπου (Sharif *et al.*, 2007). Είναι ευρέως γνωστό ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες είναι κρίσιμοι παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και ίσως η αναστολή των φλεγμονωδών κυτοκινών να είναι το κλειδί για την πρόληψη των φλεγμονωδών ασθενειών (Rose-john *et al.*, 2007).

Οι Baltzer *et al.* ανέφεραν πως η Lf βόειας και ανθρώπινης προέλευσης δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από την παρεμπόδιση της IL6 σε ανθρώπινα κύτταρα (THP-1 και PBMCs), τόσο σε μονοκύτταρα όσο και σε μακροφάγα. Αυξημένη ανασταλτική δραστηριότητα σημειώθηκε για τη Lf και για το βιοενεργό πεπτίδιο Lfcin B μετά την έκθεση των κυττάρων σε LPS, με τη Lfcin B να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας της επαγόμενης από LPS απόκρισης της IL6 (Mattsbj-Baltzer *et al.*, 1996). Η παρατήρηση αυτή διερευνήθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη των Haversen *et al.* όπου εξέτασε την ικανότητα της Lf για αναστολή γονιδιακής έκφρασης κυτοκινών που εμπλέκονται στο NF-κB σηματοδοτικό μονοπάτι. Η παραγωγή κυτοκινών ελέγχθηκε κατά τη μεταγραφή, όπως επίσης και σε μεταμεταγραφικό αλλά και σε μεταφραστικό επίπεδο. Ο NF-κB ελέγχει τη μεταγραφική δραστηριότητα προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως είναι οι IL1B, TNFA, IL6, IL8 και IL12, καθώς και άλλων γονιδίων όπως είναι μόρια προσκόλλησης (ICAM) και ένζυμα (COX2 και NOS2). Παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA των *IL1B*, *TNFA*, *IL6* και *CXCL8* σε ενεργοποιημένα THP-1 μακροφάγα που επώαστηκαν με Lf. Ακολούθησε παρόμοια

μείωση των κυτοκινών αυτών σε μεταφραστικό επίπεδο που διεξήχθη με ELISA (Håversen *et al.*, 2002).

Σε μελέτη των Kanwar *et al.* διερευνήθηκε η ανοσορυθμιστική και αντιφλεγμονώδης δράση ενός προϊόντος αποτελούμενο από 40% WPC, γνωστό ως Enprocal. Τα επίπεδα των κυτοκινών και της χημειοκίνης IL8 μετρήθηκαν με ELISA από το υπερκείμενο των THP-1 διεγερμένα με LPS και συγκρίθηκαν με αυτά. Το Enprocal μετά από *in vitro* πέψη, περιόρισε τα επίπεδα έκκρισης των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL1B και IL6 ενώ τα αύξησε για την αντιφλεγμονώδη IL10. Ωστόσο, δε σημειώθηκε καμία επίδραση του Enprocal στην παραγωγή της IL8 (Kanwar and Kanwar, 2009).

Οι Massoti *et al.* μελέτησαν την ανοσορυθμιστική δράση ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος και σόγιας στη κυτταρική σειρά U937, σε κατάσταση μονοκυττάρων και σε κατάσταση μακροφάγων (πρόκληση με 20 ng/mL TNFA για 48 ώρες). Προσδιορίστηκε η παραγωγή TGFβ με τα προϊόντα γάλακτος (ζυμωμένα ή μη) να ελαττώνουν την παραγωγή του TGFβ από τα μονοκύτταρα, όχι όμως και από τα διαφοροποιημένα μακροφάγα. Αντιθέτως, η σόγια (ζυμωμένη ή μη) δεν είχε καμία επίδραση στα μονοκύτταρα, ενώ μειώθηκε η έκκριση TGFβ από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Masotti *et al.*, 2011). Αυτό φανερώνει την αξία της προέλευσης της πρωτεΐνης και της κατάστασης των κυττάρων για την έκφραση κυτοκινών. Στην παρούσα διατριβή, η επίδραση μόνο του πρόβειου AW-D-P3 ήταν στατιστικώς σημαντική, με μειωμένα επίπεδα mRNA του *TGFβ1*, και μόνο σε κατάσταση μακροφάγων (M0 φάση).

Οι Gao *et al.* ανέφεραν πως τα πεπτίδια από λούπινο ήταν ικανά να ρυθμίσουν τη φλεγμονώδη δραστηριότητα στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW 264.7. Μετά από την *in vitro* πέψη του λούπινου, έγινε διαχωρισμός, καθαρισμός και απομόνωση 6 κλασμάτων με πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους. Στη συνέχεια, εκτέθηκαν σε RAW 264.7 μακροφάγα και μελετήθηκε η φλεγμονώδης δράση των πεπτιδίων αυτών. Παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της παραγωγής των προφλεγμονωδών IL6, IL1B και MCP1 για τα έξι κλάσματα σε σύγκριση με την ομάδα LPS, με την ισχυρότερη ανασταλτική δράση να παρουσιάζεται για το IQD πεπτίδιο (Gao *et al.*, 2020).

Οι Sabbione *et al.* μελέτησαν την επίδραση των πεπτιδίων του αμάραντου σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα. Μετά από *in vitro* πέψη, απομονώθηκε ένα ενεργό αντιθρομβωτικό πεπτιδικό κλάσμα το οποίο επώαστηκε 24 ώρες με THP-1 κύτταρα (ως προληπτική αγωγή) και ακόμη 4 ώρες με 10 μg/mL LPS. Παρατηρήθηκε μείωση για τις πρωτεΐνες IL1B και TNFA και αύξηση της χημειοκίνης MCP1 και της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9, με ανάλυση συστοιχίας κυτοκινών. Τα απομονωμένα

πεπτίδια αμάραντου ασκούν πιθανές αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές επιδράσεις στα THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα περιορίζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μονοπάτι σηματοδότησης NF-κB (Sabbione *et al.*, 2018). Ωστόσο, η MCP1 διεγείρει την έκκριση της MMP9 άμεσα μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης MAPK/ERK, η οποία σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, τη γήρανση και την απόπτωση των κυττάρων (Yang *et al.*, 2014). Επιπρόσθετα, η MCP1 είναι βασική χημειοκίνη που ρυθμίζει τη μετανάστευση και τη διείσδυση των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Απαιτείται η μετακίνηση των μονοκυττάρων μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλο το αγγειακό ενδοθήλιο τόσο για τη συνήθη ανοσιακή επιτήρηση των ιστών, όσο και κατά την απόκριση σε φλεγμονή (Deshmane *et al.*, 2009).

Σε μελέτη των Kiewiet *et al.* αναφέρεται πως η παραγωγή της IL8 μετά από επώαση μίας ημέρας σε PBMCs κύτταρα με WP σε συγκέντρωση 2 mg/mL δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ σημαντικά υψηλότερα επίπεδα παραγωγής IL8 εντοπίστηκαν μετά την επώαση με το υδρολυμένο WP (με βαθμό υδρόλυσης 15%) (Kiewiet *et al.*, 2017).

Οι Kiewiet *et al.* σε μεταγενέστερη μελέτη ερεύνησαν την ενδεχόμενη ανοσορυθμιστική δράση προϊόντων υδρόλυσης σόγιας και WP μετά από *in vitro* προσομοίωση πέψης. Δενδριτικά κύτταρα επώαστηκαν αρχικά με 2 mg/mL των υδρολυμάτων σόγιας και WP και οι κυτοκίνες IL8, IL10 και MCP1 παρουσίασαν αύξηση σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί στα υδρολύματα). Παρόμοια αύξηση των κυτοκινών παρουσιάστηκε και για το κλάσμα με πεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους (>1000 kDa). Συνεπώς, TLR ενεργοποίηση και παραγωγή κυτοκινών προκαλείται από τα προϊόντα υδρόλυσης καθώς και από το κλάσμα >1000 kDa (Kiewiet, Faas and de Vos, 2018).

Επίσης, οι Iskandar *et al.* ανέφεραν πως οι WP παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Πραγματοποιήθηκε *in vitro* ενζυμική πέψη σε 3 mg/mL λυοφιλιωμένης WP και μετά αξιολογήθηκε η επίδραση της WP σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος με τη μέθοδο ELISA. Διαπιστώθηκε καταστολή της έκκρισης της IL8 σε LPS ενεργοποιημένα κύτταρα για τις συγκεντρώσεις πάνω από 0,5 mg/mL WP, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις WP δε σημειώθηκε κάποια μεταβολή στην παραγωγή της IL8 (Iskandar *et al.*, 2013).

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Piccolomini *et al.* έδειξαν αναστολή της απελευθέρωσης της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL8, υποστηρίζοντας ότι τα προϊόντα υδρόλυσης WPI ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση στα εντερικά κύτταρα Caco-2 που

έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό μέσο. Ως ερέθισμα χρησιμοποιήθηκε το H₂O₂ σε συγκέντρωση 0,25 mM και η επίδραση του WPI ήταν δοσοεξαρτώμενη (αυξανόμενης της συγκέντρωσης WPI, παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης της IL8 (Piccolomini *et al.*, 2012).

Σε μελέτη των Grancieri *et al.* αναφέρεται πως η πρωτεΐνη από σπόρους τσίας και κλάσματα αυτής μετά από *in vitro* πέψη έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, επισημαίνεται πως σε ενεργοποιημένα μακροφάγα RAW 264.7 που έγινε έκθεση σε γλουτελίνη (πρωτεϊνικό κλάσμα τσίας), οδήγησε σε μείωση της έκκρισης τόσο του NF-κB, όσο και των IL6, IL10 και ICAM σε σύγκριση με τα LPS κύτταρα (Grancieri, Martino and Gonzalez de Mejia, 2019). Η μετατόπιση του NF-κB προκαλεί την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως είναι οι ιντερλευκίνες 6 και 10 που μπορεί να ενεργοποιήσει αρνητικά την ανοσολογική απόκριση, προκαλώντας μια σειρά από ασθένειες.

Η IL6 είναι μία κυτοκίνη με πλειοτροπική δράση και ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα όπως είναι το LPS, κυτοκίνες πχ. η IL1B, ιοί και αντιγονικά ερεθίσματα και παρατηρούνται υψηλά επίπεδα IL6 στον ορό σε παθολογικές καταστάσεις, όπως κατά τη διάρκεια μίας φλεγμονής ή/και σε αυτοάνοσα νοσήματα (Taga, 1997). Επίσης, η IL6 είναι σημαντική στην τελική διαφοροποίηση των B-κυττάρων σε πλασμοκύτταρα και είναι χαρακτηριστική προφλεγμονώδης κυτοκίνη για τα M1 μακροφάγα ενώ για τα M2 μακροφάγα είναι η IL10 και αναστέλλει τη δημιουργία κυτταρομεσολαβούμενων ανοσοαποκρίσεων (Shu *et al.*, 2022). Η IL10 είναι μία κυτοκίνη με πλειοτροπική δράση και παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων όπως T- κύτταρα και μονοκύτταρα. Έχει αναφερθεί από προηγούμενες έρευνες πως η IL8 είναι η κύρια πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε κύτταρα Caco-2 και ο βασικός της ρόλος είναι να προσελκύσουν και να ενεργοποιήσουν τα ουδετερόφιλα κατά την οξεία φλεγμονώδη απόκριση (Van De Walle *et al.*, 2010). Η COX2 είναι ένα επαγωγίμο ένζυμο που καταλύει τη βιοσύνθεση της προσταγλανδίνης E2 και έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονής. Υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι οριακά ανιχνεύσιμο το ένζυμο αυτό, αλλά όπως και άλλα γονιδιακά προϊόντα πρώιμης απόκρισης, παράγεται γρήγορα και παροδικά από ενδοτοξίνες ή/και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και είναι ένα μόριο που λαμβάνει χώρα στη διαδικασία διαδοχικών σταδίων μέσω p38 MAPK και JNK ή/και NF-κB σηματοδοτικών μονοπατιών (Surh *et al.*, 2001). Το ICAM1 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ως δείκτης χρόνιας φλεγμονής στις αθηρωματικές πλάκες (Zhu *et al.*, 2018).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Toorcham *et al.* μελετήθηκε η ανοσορυθμιστική δράση υδρολύματος καζεΐνης συγκέντρωσης 0,1 mg/mL σε THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με LPS συγκέντρωσης 0,5 ng/mL για 6 ώρες. Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, του ενζύμου COX2 και των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL1B και IL6, συνεπάγοντας την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση του προϊόντος υδρόλυσης της καζεΐνης με την πρωτεΐνωση *V. halodenitrificans* SK1-3-7 (Toorcham *et al.*, 2017).

Οι Ma *et al.* ασχολήθηκαν με την πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση πεπτιδίων, που προέκυψαν από υδρόλυση του WP με αλκαλάση, σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκλήθηκαν από LPS σε μακροφάγα RAW 264.7. Οι *TNFA*, *IL1B* και *COX2* επιλέχθηκαν ως δείκτες φλεγμονής και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA τους σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις LPS (10 και 100 μg/mL), με ισχυρή ανασταλτική δράση να παρουσιάζεται για το DQWL και να αναφέρεται η πιθανή μεσολάβση της αναστολής των NF-κB και p38 MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών (Ma *et al.*, 2016).

Οι Ishikawa *et al.* μελέτησαν την επίδραση του WPH κατά τη φλεγμονή και κατά την ανοσοκαταστολή, στοχεύοντας στην ανοχή στις ενδοτοξίνες ως ανοσοκατασταλτική κατάσταση. Τα THP-1 κύτταρα επώαστηκαν ταυτοχρόνως με LPS και WPH για *in vitro* προσομοίωση της φλεγμονής του οργανισμού και εκ νέου διέγερση με την ίδια ενδοτοξίνη για *in vitro* προσομοίωση της ανοσοκαταστολής. Μετά την έκθεση των μονοκυττάρων σε 5 mg/mL WPH και 1 μg/mL LPS παρατηρήθηκε μείωση παραγωγής των IL6 και IL10 και καμία επίδραση του TNFA, ενώ μετά τη δεύτερη διέγερση με LPS, σημειώθηκε αύξηση παραγωγής IL10 και TNFA (Ishikawa *et al.*, 2022).

Η μόνη επίδραση εντοπίστηκε για το SW-D-P3 πρόβειας προέλευσης σε THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα που ήταν σημαντικά υψηλότερη για την έκφραση του *TNFA* σε σύγκριση με τα άλλα είδη SW-D-P3. Ωστόσο, καμία επίδραση δε σημειώθηκε για AW-D-P3 και SW-D-P3 σε μακροφάγα THP-1, ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1 και RAW 264.7. Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα είναι η μελέτη των Mros *et al.* που αφορά τη δράση του TNFA σε THP-1 κύτταρα. Είναι προφλεγμονώδης κυτοκίνη και απελευθερώνεται ως απάντηση στο LPS, IL1β και άλλα βακτηριακά προϊόντα και βασικός ρόλος του TNFA σχετίζεται με την ανοσορύθμιση. Πιο συγκεκριμένα, καμία διαφορά στην παραγωγή TNFA δεν παρουσιάστηκε για κανένα γάλα, μετά από *in vitro* πέψη, σε διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση της φλεγμονώδους απόκρισης TNFA, ειδικά για το πρόβειο γάλα, κατά την διέγερση των διαφοροποιημένων THP-1 μακροφάγων με LPS. Αυτό υποδηλώνει ότι το γάλα μετά από την πέψη, θα μπορούσε να διαδραματίσει κάποιον

ρόλο *in vivo* σε περιπτώσεις φλεγμονής (Mros *et al.*, 2017). Πρωτεομική ανάλυση που διεξήχθη σε πρόβειο ορό γάλακτος (από την ίδια ερευνητική ομάδα), σε σύγκριση με αποτελέσματα πρωτεομικών αναλύσεων βόειου ορού (από την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία), είχε εμφανίσει ομοιότητες αλλά και αρκετές διαφορές (Ha *et al.*, 2015).

Επίσης, σε κλινική μελέτη των Meyer *et al.* αναφέρθηκε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών μετά την χορήγηση γιαουρτιού, συμβατικού ή εμπλουτισμένου με *L. Casei* σε δείγμα 37 υγιών γυναικών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση *in vitro* παραγωγής TNFA κυρίως μετά τη δεύτερη εβδομάδα κατανάλωσης γιαουρτιού, ανεξαρτήτως εμπλουτισμού ή μη με γαλακτοβάκιλλο σε απομονωμένα PBMCs και διεγερμένα *in vitro* με LPS (Meyer *et al.*, 2007).

Σε πρόσφατη έρευνα των Liang *et al.* μελετήθηκε η πιθανή ανοσορυθμιστική δράση πεπτιδίων γάλακτος ανθρώπινης προέλευσης. Πραγματοποιήθηκε πέψη *in vivo* (n=8) και *in vitro* (THP-1 μακροφάγα, ενεργοποιημένα με 10 ng/mL LPS) του μητρικού γάλακτος και έπειτα έγινε εκχύλιση και κλασμάτωση πεπτιδίων. Το μη κλασματοποιημένο *in vitro* μίγμα πεπτιδίων δεν τροποποίησε σημαντικά την έκκριση TNF και IL8 σε εύρος συγκεντρώσεων 10-100 µg/mL. Αντιθέτως, το μη κλασματοποιημένο *in vivo* μίγμα πεπτιδίων μείωσε την παραγωγή TNF και IL8 για τη συγκέντρωση 100 µg/mL. Με τα παραπάνω ευρήματα καθώς και την πεπτιδομική ανάλυση που έγινε στη συγκεκριμένη μελέτη, αποδεικνύεται για ακόμη μία φορά, η πολυπλοκότητα του γαστρεντερικού συστήματος (Liang *et al.*, 2021). Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να οφείλεται στο πρωτεολυτικό δυναμικό του μικροβιώματος του εντέρου, καθώς είναι γνωστό πως τα ένζυμα από τη μικροχλωρίδα του εντέρου υδρολύουν πρωτεΐνες και πεπτίδια, τα οποία απουσιάζουν στα *in vitro* μοντέλα (Boutrou, Henry and Sanchez-Rivera, 2015).

Ένας ακόμη παράγοντας εξίσου σημαντικός είναι ο ρυθμός υδρόλυσης των πρωτεϊνών του γάλακτος κατά τη πέψη. Οι πρωτεΐνες αυτές κατηγοριοποιούνται σε πρωτεΐνες ταχείας και αργής πεπτικότητας, εξαρτώμενη από το χρόνο, όπου προσδιορίζονται με αύξηση των αμινοξέων στο πλάσμα μετά την πρόσληψη της τροφής (Boirie *et al.*, 1997). Οι πρωτεΐνες του ορού συχνά αναφέρονται ως γρήγορες πρωτεΐνες και οι καζεΐνες ως αργές. Πρόσφατα, μελετήθηκε η έκκριση των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNFA, IL1B και IL6 από THP-1 ενεργοποιημένα μακροφάγα με 50 ng/mL LPS. Πιο συγκεκριμένα, σε τρεις διαφορετικές συνθέσεις με βάση τον ορό του γάλακτος [100:0 (WP:CN) χωρίς β-CN, 60:40 (WP:CN) με 0,35% β-CN, 60:40 (WP:CN) με 0,45% β-CN] πραγματοποιήθηκε *in vitro* προσομοίωση πέψη και έπειτα επώαστηκαν σε συγκαλλιέργεια κυττάρων Caco-2 και THP-1 και ελέγχθηκε η επίδραση των προϊόντων

πέψης στα επίπεδα TNFA, IL1B και IL6. Καμία σημαντική διαφορά δε σημειώθηκε για το προϊόν πέψης προερχόμενο μόνο από WP, σε αντίθεση με τις φόρμουλες που περιείχαν και ποσοστό CN (Tari, 2018).

Η επίδραση της τεχνολογικής επεξεργασίας των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως είναι η θέρμανση, η παστερίωση, η ζύμωση και η ωρίμανση, είναι καίρια για το προφίλ των βιοενεργών πεπτιδίων που απελευθερώνονται μετά την *in vitro* πέψη (Baptista and Gigante, 2021; Murtaza *et al.*, 2022). Η μελέτη των Korf-Bolanz *et al.* έδειξε ότι η αποικοδόμηση της β-Lg από προϊόντα που είχαν υποστεί ζύμωση και από θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα, ήταν διαφορετική μετά από *in vitro* πέψη, παρά το γεγονός των αρχικών συγκρίσιμων ποσοτήτων της β-Lg στις δύο αυτές κατηγορίες (Korf-Bolanz *et al.*, 2014).

Η ζύμωση τροποποιεί τα συστατικά του γάλακτος, παράγοντας ένα ευρύ φάσμα από μεταβολίτες και βιοενεργά συστατικά συμπεριλαμβανομένων των ανοσορυθμιστικών πεπτιδίων και τα ανοσορυθμιστικά παράγωγα τρυπτοφάνης και γλουταμικού, CLA και εξωπολυσακχαρίτες. Σε πρόσφατη έρευνα αναφέρεται πως το γάλα που είχε υποστεί ζύμωση με *L. rhamnosus* R0011 είχε επίδραση στη ρυθμιστική και προφλεγμονώδη παραγωγή κυτοκινών (Jeffrey *et al.*, 2020). Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης, η U937 και η THP-1 και εξετάστηκε το ανοσορυθμιστικό δυναμικό. Σημειώθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή της IL10 από ενεργοποιημένα (125 ng/mL LPS για 24 ώρες) μακροφάγα U937 και THP-1 που εκτέθηκαν σε ζυμωμένο γάλα σε σχέση με εκείνα που εκτέθηκαν σε μη ζυμωμένο γάλα. Η παραγωγή της κυτοκίνης IL10 από τα μακροφάγα είναι χαρακτηριστικό της πόλωσης προς το M2 φαινότυπο (Shiratori *et al.*, 2017). Επίσης, στη συγκεκριμένη έρευνα παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ THP-1 και U937 και είναι πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό ιστό προέλευσης, το διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης μεταξύ αυτών των δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών καθώς επίσης και στην τάση πόλωσης, με τα THP-1 να ανταποκρίνονται σε M1 ερεθίσματα ενώ τα U937 σε M2 ερεθίσματα (Baek *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2022).

Σε μελέτη των Lin *et al.* διερευνήθηκε η επίδραση της α-La στα μόρια κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, COX2 και NOS2, στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW 264.7. Δεν υπήρχε επίδραση του εμπορικού σκευάσματος της α-La στην έκφραση της iNOS και COX2 πρωτεΐνης και της παραγωγής NO και PGE2, αντίστοιχα, σε κύτταρα RAW 264.7 που εκτέθηκαν σ 1 μg/mL LPS σε σύγκριση με τα LPS κύτταρα. Επίσης, δε σημειώθηκε στατιστικώς

σημαντική διαφορά της παραγωγής NO ανάμεσα σε κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε LPS με κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε 0,15-50 $\mu\text{g/mL}$ $\alpha\text{-La}$ (Lin and Kuo, 2010).

Οι IRFs και STATs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, ρύθμιση και εξειδίκευση των μακροφάγων, όπως είναι οι IRF4 και IRF5 που παρουσιάζονται να εμπλέκονται στην πόλωση M2 και M1, αντίστοιχα (Krausgruber *et al.*, 2011; Lawrence and Natoli, 2011). Η σηματοδότηση μέσω MYD88 ενεργοποιεί τον IRF5, ενώ το μη εξαρτώμενο MYD88 σηματοδοτικό μονοπάτι προκαλεί αποκρίσεις μέσω ενεργοποίησης του IRF3 (Kawai and Akira, 2010). Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης πως οι STAT1 και STAT2, που προκαλούνται από ερεθίσματα όπως IFNs τύπου I και LPS, συμμετέχουν στην M1/M2 διαφοροποίηση, με τους 2 αυτούς μεταγωγείς σήματος να προάγουν τη M1 πόλωση (Tugal, Liao and Jain, 2013). Στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA του *STAT1* για αγελαδινό και αίγιο SW-D-P3, για το STAT2 μείωση για αγελαδινό, αίγιο και πρόβειο, καθώς επίσης καμία διαφορά δε σημειώθηκε για IRF5 στα μακροφάγα. Με την ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS, η εικόνα άλλαξε με το STAT1 και STAT2 να μην παρουσιάζουν στατιστικές σημαντικές αλλαγές σε σχέση με το BL-D-P3 και για το IRF5 να σημειώνεται στατιστικώς σημαντική πτώση, ανεξαρτήτως ζωικής προέλευσης. Διαφορετικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για AW-D-P3, όπου η μόνη διαφορά που εντοπίστηκε στα μακροφάγα ήταν σε πρόβειο AW-D-P3 με τα επίπεδα mRNA του *STAT2* να είναι χαμηλά. Μετά την πρόκληση των κυττάρων με LPS, σημειώθηκε αύξηση της έκφρασης *STAT1* μόνο για αίγιο και αγελαδινό, όχι όμως για πρόβειο AW-D-P3, όπου και παρουσίασε μείωση της έκφρασης του IRF5, αποδεικνύοντας τη σημασία της διαφορετικής ζωικής προέλευσης στην πόλωση των μακροφάγων.

Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί και παραδοχές στη σύγκριση των μελετών με την παρούσα διατριβή. Μερικές μελέτες δεν έχουν λάβει υπόψη την πέψη και την απορρόφηση των προϊόντων που επιβάλλεται να πραγματοποιηθεί για να μελετηθεί στη συνέχεια η επίδρασή τους *in vitro* ως προς τις ανοσορυθμιστικές του ιδιότητες χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές ή PBMCs. Επίσης, άλλες μελέτες δεν έχουν λάβει υπόψιν το εύρος των φυσιολογικών συγκεντρώσεων του προϊόντος που μπορεί να λάβει ένας οργανισμός *in vivo*. Τέλος, παράγοντες όπως ο βαθμός υδρόλυσης του προϊόντος ή η προσομοίωση πέψης με διαφορετικά ένζυμα είναι καθοριστικής σημασίας.

Επίσης, η εποχικότητα και η γεωγραφική προέλευση συλλογής των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων είναι αξιόλογοι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του γάλακτος,

τις φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και ίσως επηρεάζουν και τις ανοσορυθμιστικό, αντιυπερτασικό και αντιοξειδωτικό δυναμικό. Προηγούμενες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διαφορετική ποιότητα και ποσότητα πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και υποπροϊόντα και στα κλάσματα αυτών. Επιπρόσθετα, η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση και την ποιότητα του γάλακτος. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ποικίλλει μεταξύ των ειδών και επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι η φυλή, το στάδιο της γαλουχίας, η διατροφή, το κλίμα, η εποχή και η κατάσταση της υγείας του μαστού (Y. W. Park *et al.*, 2007).

Στα παραδοσιακά συστήματα, η μεταβατική περίοδος είναι κρίσιμη για τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, όπου η διατροφή τους αλλάζει καθώς από τους βοσκοτόπους, περιορίζονται σε σύστημα εσωτερικού χώρου με διαφορετικά σιτηρέσια. Οι επακόλουθες αλλαγές στη διατροφή, εάν πραγματοποιηθούν γρήγορα, μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα και την ποιότητα του γάλακτος. Επίσης, η γεωγραφική προέλευση, με τη διαφορετικότητα που επικρατεί στο κλίμα και στη χλωρά νομή, είναι ένας ακόμη παράγοντας που ίσως επηρεάζει το προφίλ των συστατικών του γάλακτος και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών του γάλακτος.

Οι Kuczynska *et al.* αναφέρουν υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνών BSA, Lf και λυσοζύμης στο γάλα που συλλέχθηκε από σταβλισμένα ζώα κατά το μήνα Νοέμβρη στην Πολωνία σε σύγκριση με το ημικτατικό σύστημα κατά το μήνα Σεπτέμβρη. Αυτό δείχνει ότι η παράταση της περιόδου βόσκησης δε συνιστάται καθώς η συγκέντρωση σημαντικών βιοενεργών πεπτιδίων από WP είναι περιορισμένη (Kuczyńska *et al.*, 2012). Σε αντίθεση, οι Lin *et al.* σημειώνουν πως η εποχή συλλογής του γάλακτος από αγελάδες γαλακτοπαραγωγής Holstein, δεν επηρέασε πολλές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων ολικής πρωτεΐνης, μη πρωτεϊνικού κλάσματος, καζεΐνης, πρωτεΐνης ορού γάλακτος, ολικού ασβεστίου καθώς και το pH, ή τα χαρακτηριστικά θερμικής σταθερότητας. Η εποχικότητα είχε επίδραση στο ποσοστό των καζεϊνών, ανάμεσα σε α_s - και κ- καζεΐνες, με το χαμηλότερο ποσοστό α_s καζεϊνών να εντοπίζονται την άνοιξη και το φθινόπωρο να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό (Lin *et al.*, 2017).

Σε μελέτη των Hejtmánková *et al.* αξιολογήθηκαν οι διαφορές της σύστασης του ορού του γάλακτος ανάμεσα σε σε αίγιο και πρόβειο καθ' όλη της διάρκειας της γαλακτικής περιόδου. Συνολικά, σημειώθηκε μεγαλύτερο ποσοστό WP και της β -Lg για το πρόβειο γάλα, με μεγαλύτερες διακυμάνσεις να σημειώνονται για το πρόβειο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Επίσης, υψηλότερη περιεκτικότητα σε WP γάλα

παρατηρήθηκε στο πρόβειο γάλα στην αρχή και το τέλος της περιόδου της γαλουχίας (Hejtmánková *et al.*, 2012). Σε άλλη μελέτη αξιολογήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση της φυλής (Simmental και Holstein-Friesian) και της εποχικότητας (άνοιξη με καλοκαίρι και φθινόπωρο με χειμώνα) ως προς WP και έδειξε να υπάρχουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις για όλες τις υπό μελέτη WP. Επίσης, στα καλοκαιρινά δείγματα γάλακτος εντοπίστηκε υψηλότερο περιεχόμενο α -La και β -Lg (Brodziak *et al.*, 2012).

Ακόμη μία μελέτη ενισχύει την άποψη της επίδρασης της εποχής, της γεωγραφικής προέλευσης του WP, αυτή τη φορά προερχόμενο το WP μετά την τυροκόμηση [από δύο διαφορετικούς τύπους τυριών (τσένταρ και ολλανδικό)]. Η επίδραση της εποχής στη σύσταση του WP ήταν πιο ξεκάθαρη για το τυρί τύπου τσένταρ. Επίσης, αυξημένο περιεχόμενο σε στερεά συστατικά, λίπος και ανόργανων συστατικών σημειώθηκε για το WP που συλλέχθηκε από το βόρειο τμήμα της Νορβηγίας (Johansen, Vegarud and Skeie, 2002). Επίσης, οι Martin αξιολόγησαν το στάδιο της γαλουχίας και της εποχής στην εποχιακή διακύμανση που σημειώνεται στη σύσταση του γάλακτος από αγελάδες γαλακτοπαραγωγής εκτατικού συστήματος στη Νέα Ζηλανδία. Ένα αξιόλογο συμπέρασμα ήταν πως η συγκέντρωση σε συστατικά του γάλακτος, μεταξύ των οποίων και οι καζεΐνες και οι WP, σημειώνει αύξηση καθώς προχωρούσε η γαλουχία και εξαρτιόταν και από την εποχή του έτους, ενώ η αναλογία CN:WP και πρωτεΐνης:λίπους επηρεάστηκαν μόνο από την εποχή του έτους (Auldist, Walsh and Thomson, 1998). Παλαιότερη μελέτη στην Αυστραλία είχε επικεντρωθεί στις εποχιακές μεταβολές στις φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες του WPC (Regester *et al.*, 1992) αφού πρώτα είχαν μελετήσει τις αλλαγές σε β -Lg, α -La και GMP σε WPC κατά τη γαλουχία. Παρατηρήθηκε μείωση της α -La και αύξηση της β -Lg κατά την παρασκευή του WPC το τελευταίο τρίμηνο της γαλουχίας, ενώ το πρώτο τετράμηνο σημειώθηκε αύξηση της καζεΐνης στο WPC (Regester and Smithers, 1991). Τέλος, αυτές οι εποχιακές αλλαγές τόσο στη σύσταση όσο και στις ιδιότητες του γάλακτος προκαλούν προβλήματα, αλλά δίνουν και ευκαιρίες στους παραγωγούς γαλακτοκομικών προϊόντων (Chen, Lewis and Grandison, 2014).

Από τις προαναφερθείσες μελέτες, γίνεται αντιληπτό πως η εποχικότητα και η γεωγραφική προέλευση είναι δύο παράγοντες που επηρεάζουν ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων. Στην παρούσα διατριβή, όσον αφορά το SW-D-P3 δεν είχε σημαντική επίδραση σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές, ως προς την εποχικότητα. Παρόμοια αποτελέσματα και για το AW-D-P3 για την κατάσταση της ήπιας φλεγμονής, με εξαίρεση τα επίπεδα mRNA των *IL1B*, *TGFBI*, *NFKBI* και *SOD1* τα όποια ήταν αυξημένα κατά την περίοδο του χειμώνα. Ο

παράγοντας της γεωγραφικής προέλευσης έδειξε μερικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων, χωρίς όμως να υπάρχει συγκεκριμένο μοτίβο. Στα μακροφάγα THP-1, εντοπίστηκε διαφορά για τα δείγματα με προέλευση από τη Δυτική Ελλάδα και Θεσσαλία, με αυξημένη έκφραση για αρκετά από τα γονίδια που εξετάστηκαν, πράγμα που εντοπίστηκε και στα ενεργοποιημένα μακροφάγα THP-1, όχι όμως στα RAW 264.7. Σε αντίθεση, λιγότερες διαφορές στη γονιδιακή έκφραση επισημάνθηκαν για το AW-D-P3, με τα δείγματα AW που συλλέχθηκαν από τη Μακεδονία και Θράκη να δείχνουν μία διαφορετική εικόνα. Ωστόσο, δεν είναι εφικτό να διεξαχθεί ένα γενικότερο συμπέρασμα για τους δύο αυτούς παράγοντες καθώς τόσο η απουσία προηγούμενων παρόμοιων μελετών καθώς και η διεξαγωγή αμφιλεγόμενων αποτελεσμάτων, δεν μου το επιτρέπει. Για να διερευνηθούν εις βάθος μελλοντικά αυτοί οι δύο παράγοντες, μεγαλύτερο πλήθος δειγμάτων θα ήταν απαραίτητος, με στόχο τη μελέτη του ανοσορυθμιστικού δυναμικού των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων.

Επίσης, έγινε χρήση μίας ακόμη κυτταρικής σειράς, των RAW 264.7 μακροφάγων, για την αξιολόγηση του αντιφλεγμονώδους δυναμικού των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων. Εκτός της γονιδιακής έκφρασης των *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* και *Tnf*, αξιολογήθηκε και παραγωγή NO. Το NO είναι ένας ουσιαστικός βιολογικός μεσολαβητής στον ζωντανό οργανισμό που συντίθεται από την L-αργινίνη, χρησιμοποιώντας NADPH και μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή του NO που καταλύεται από το iNOS, ένα διαλυτό ένζυμο και ενεργό στη διμερή του μορφή, είναι κυτταροτοξική. Το LPS ενεργοποιεί το iNOS και παράγονται υψηλές συγκεντρώσεις NO μέσω NF-κB (Aktan, 2004).

Σε μεταγραφικό επίπεδο, δεν σημειώθηκαν διαφορές για το AW-D-P3, σε αντίθεση με το SW-D-P3 που υπήρχε στατιστικώς σημαντική μείωση έκφρασης του *Nos2* στα ενεργοποιημένα μακροφάγα μετά από επώαση με πρόβειο και αίγιο SW-D-P3. Σε λειτουργικό επίπεδο, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση παραγωγής NO και για τα δύο υποπροϊόντα. Αναστολή του NO σημειώθηκε για το πρόβειο SW-D-P3 καθώς και για το πρόβειο και αίγιο AW-D-P3 σε σύγκριση με το BL-D-P3. Να σημειωθεί πως σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών για *NOS2* και *PTGS2* για τη μελέτη των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων των υποπροϊόντων με τη χρήση των THP-1, με τα Cp's να είναι >33 (Ozleyen, Yilmaz and Tumer, 2021) και να μη θεωρούνται αξιόπιστα.

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν την επίδραση των γαλακτοκομικών προϊόντων, υποπροϊόντων και των πρωτεϊνών τους την αντιφλεγμονώδη δράση τους σε RAW 264.7. Μελέτη των Zhao *et al.* έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων των νιτρικών έπειτα από επώαση 12 ωρών αίγιου WP δύο διαφορετικών φυλών και σε εύρος

συγκεντρώσεων (1-8 mg/mL) και εν συνεχεία 8 ωρών μαζί με LPS στην κυτταρική σειρά RAW 264.7, επιβεβαιώνοντας πως οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος έχουν αντιφλεγμονώδη δράση (Zhao, Li, *et al.*, 2023). Οι Pinho *et al.* μελέτησαν την αντιφλεγμονώδη δράση αποβουτυρωμένου γάλακτος του εμπορίου, μετά από *in vitro* προσομοίωση γαστρεντερική πέψη σε ενεργοποιημένα (1 µg/mL LPS για 22 ώρες) μακροφάγα. Σημειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα NO για το γάλα που είχε υποστεί πέψη, ανεξαρτήτως προέλευσης (ηπειρωτική Πορτογαλία και νησιά Αζόρες) (Pinho *et al.*, 2021). Επίσης, οι Chun *et al.* επισήμαναν την αναστολή παραγωγής NO εκθέτοντας τα ενεργοποιημένα (10 ng/mL LPS) μακροφάγα για 24 ώρες με WPC, ενώ σημειώθηκε αύξηση της παραγωγής NO με την έκθεση των RAW 264.7 σε γλυκοζυλιωμένο WPC, αναφέροντας πως η γλυκοζύωση θα μπορούσε να έχει διεγερτική επίδραση στα μακροφάγα (Chun *et al.*, 2020). Ωστόσο, οι Kim *et al.* διαπίστωσαν πως το γλυκοζυλιωμένο WPI με επακόλουθη ζύμωση με *Lactobacillus gasseri*, είναι ικανό να αναστείλει την παραγωγή NO στα ίδια κύτταρα (Kim *et al.*, 2019). Άλλη μελέτη ανέφερε πως υδρόλυμα WPC που είχε υποστεί επεξεργασία με αλκαλάση σε συγκέντρωση 0,25 mg/mL, εμφάνισε σημαντική μείωση στην παραγωγή νιτροδών και μειωμένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών TNFA, IL6 and IL1B (Mansinhbhai *et al.*, 2022). Σε παρόμοια μελέτη, οι Prakash *et al.* έδειξαν πως η παραγωγή NO ήταν αυξημένη σε κύτταρα RAW 264.7 μετά από προσθήκη υδρολύματος WPC σε σύγκριση με τα μακροφάγα που δεν είχαν εκτεθεί σε προϊόν υδρόλυσης (Prakash *et al.*, 2022). Σε έρευνα των Bamdad *et al.* μελετήθηκε η πιθανή αντιφλεγμονώδης δράση CN και προϊόντων υδρόλυσης (συνδυασμός υψηλής υδροστατικής πίεσης με ενζυμική υδρόλυση) CN σε LPS διεγερμένα RAW 264.7. Ενώ παρουσιάστηκε μειωμένη παραγωγή νιτροδών για τα υδρολύματα CN, καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δε σημειώθηκε με τη έκθεση των κυττάρων σε CN (Bamdad *et al.*, 2017).

Οι Dineshbhai *et al.* μελέτησαν την αντιφλεγμονώδη δράση του WPC που είχε υποστεί ζύμωση με *L.fermentum* (KGL4) και σημείωσαν παρεμπόδιση του NO σε ενεργοποιημένα μακροφάγα (Dineshbhai *et al.*, 2022). Παρόμοια αποτελέσματα αντιφλεγμονώδους δράσης παρουσιάστηκαν για πρόβειο γάλα που είχε υποστεί ζύμωση με τον ίδιο μικροοργανισμό (*L.fermentum*) στην κυτταρική σειρά RAW 264.7 (Ashokbhai *et al.*, 2022). Σύμφωνα με άλλη μελέτη, προϊόν ζύμωσης γάλακτος καμήλας με *Lacticaseibacillus casei* (NK9) παρουσίασε αναστολή παραγωγής NO σε ενεργοποιημένα RAW 264.7 σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε προϊόν ζύμωσης (Dharmisthaben *et al.*, 2023).

Οι Phelan *et al.* εξέτασαν αρχικά την ανασταλτική δράση του ACE πεπτιδίων που προέρχονται από το γάλα και εντόπισαν δύο νέα πεπτίδια της β-CN, τα QSWMHQPHQ YYAKPAAVR με αντιυπερτασική δράση. Έπειτα, για τα δύο αυτά πεπτίδια αναφέρθηκε και ανασταλτική δράση του NO σε συγκέντρωση 100 μM σε ενεργοποιημένα (1 μg/mL LPS, 24 ώρες επώαση) RAW 264.7 (Phelan *et al.*, 2014). Αξίζει να αναφερθεί ότι δύο συνθετικά πεπτίδια από βουβαλίσιο WP, τα DQPFFHYN και YSPFSSFPR, έδειξαν δόσοεξαρτώμενη αναστολή NO σε κύτταρα RAW 264.7 και μείωση προφλεγμονωδών κυτοκινών που είχαν διεγερθεί από LPS, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό μηχανισμό αυτών των πεπτιδίων έναντι της ενδοτοξίνης (Zhao, Zheng, *et al.*, 2023).

Επιπρόσθετα σε πρόσφατη μελέτη των Espindola *et al.* μελετήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση του WPI, μετά από *in vitro* πέψη σε Caco-2 κύτταρα, συμπεραίνοντας πως αυτή η κυτταρική σειρά εντερικού επιθηλίου δε θεωρείται υπεύθυνη για την παραγωγή/αναστολή του NO, καθώς δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα NO σε διεγερμένα με ή χωρίς H₂O₂ (de Espindola *et al.*, 2023). Σε ένα *in vivo* πείραμα χορηγήθηκε WP και υδρολύματα αυτών σε επίμυες και SHR επίμυες και μετρήθηκε η αναλογία νιτρικών/νιτρώδη, η οποία είναι μία μέτρηση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου. Ενώ συγκρίνοντας την αναλογία νιτρικά/νιτρώδη στο αίμα των επίμυων με τους SHR επίμυες παρουσιάστηκε να ελαττώνεται, όταν χορηγήθηκε WP ή/και υδρολύματα αυτών, η αναλογία αυτή ανακτήθηκε, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο το αντιφλεγμονώδες δυναμικό των SHR επίμυων (Park *et al.*, 2017).

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής μελετήθηκε η αντιυπερτασική δράση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, τυρογάλακτος και ΟΟΓ πριν την *in vitro* προσομοίωση πέψη όσο και μετά την πέψη για τα δύο κλάσματα, <10 kDa (SW-D-P10 και AW-D-P10) και <3 kDa (SW-D-P3 και AW-D-P3) και μελετήθηκαν και ως προς τους παράγοντες της ζωικής και γεωγραφικής προέλευσης και εποχικότητας. Αναφορικά με την επίδραση της γαστρεντερικής πέψης, είναι σαφές πως η αντιυπερτασική δράση μέσω αναστολής του ACE, είναι στατιστικά σημαντικά σε υψηλότερα επίπεδα και για τα δύο γαλακτοκομικά υποπροϊόντα, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών σε πεπτίδια για την ανάδειξη των αντιυπερτασικών ιδιοτήτων. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα για την εύρεση συγκεκριμένων αντιυπερτασικών πεπτιδίων δεν πραγματοποιήθηκε.

Ελάχιστες έρευνες έχουν ασχοληθεί με την ACE ανασταλτική δράση γαλακτοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων μετά από *in vitro* πέψη. Η μελέτη των Bamdad *et al.* επιχειρώντας να εντοπίσει ACE ανασταλτικά πεπτίδια της φακής μετά από την πέψη,

πραγματοποίησε τη σύγκριση με WPC. Στη μελέτη παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα ACE μετά την πέψη με τα επίπεδα να αγγίζουν το 76% για φακή και 92% για WPC, ενώ πριν την πέψη τα επίπεδα αυτά να είναι πολύ χαμηλά, με 11% και 14%, αντίστοιχα (Bamdad *et al.*, 2017). Οι Bustamante *et al.* μελέτησαν την αντιυπερτασική δράση του τυρογάλακτος (μετά την παρασκευή τυριού διπλής κρέμας που προέκυψε από υπερδιήθηση) και των υδρολυμάτων τυρογάλακτος που προέκυψαν από τρία διαφορετικά ένζυμα (αλκαλάση, χυμοτρουσίνη και flavourzyme) πριν και μετά από *in vitro* πέψη. Παρατηρήθηκε μειωμένη ACE ανασταλτική δραστηριότητα για τα υδρολύματα αλκαλάσης και χυμοτρουσίνης μετά τη πέψη, που ίσως να οφείλεται στο γεγονός πως ορισμένα πεπτίδια με δυνατότητα αναστολής ACE να αποικοδομούνται και να μετατρέπονται σε ανενεργά μόρια κατά την προσομοίωση πέψης. Αντιθέτως, τα υδρολύματα τυρογάλακτος με flavourzyme δε σημείωσαν κάποια αλλαγή κατά την πέψη και αυτό υποδηλώνει πως τα πεπτίδια που υπάρχουν σε αυτό το υδρόλυμα μπορούν να ανθίστανται κατά την πέψη ή υδρολύονται μερικώς σε άλλα μικρότερα μόρια χωρίς την απώλεια της αντιυπερτασικής τους δράσης. Δε σημειώθηκε κάποια αλλαγή στο WPC πριν και μετά την πέψη, με χαμηλές τιμές ACE να καταγράφονται (Bustamante *et al.*, 2021).

Σε μελέτη των Dabarera *et al.* πραγματοποιήθηκε διερεύνηση αντιυπερτασικών πεπτιδίων από δύο διαφορετικά εμπορικά προϊόντα τυρογάλακτος πριν και μετά από *in vitro* πέψη. Είχαν περίπου τις ίδιες κορυφές τα δύο αυτά προϊόντα, αναλύοντάς τα με HPLC, δηλαδή υπήρχε παρουσία ίδιων πεπτιδίων, με διαφορετική περιοχή κάτω από τις αυτές τις κορυφές, άρα και διαφορετική συγκέντρωση πεπτιδίων. Επίσης, η ACE ανασταλτική δράση μετά την πέψη ήταν σημαντικά υψηλότερη και για τα δύο σκευάσματα (Dabarera, Athiththan and Perera, 2015). Επίσης, σε παλαιότερη μελέτη των Vermeirssen *et al.* διερευνήθηκε η αντιυπερτασική δράση του WPI μετά από *in vitro* γαστρεντερική πέψη και εν συνεχεία μετά την υπερδιήθηση/φυγοκέντρωση, για το κλάσμα που αποτελείται από πεπτίδια μοριακού βάρους <3 kDa και τέλος μετά την κλασμάτωση με HPLC. Ήταν φανερό η πτώση του IC₅₀, με τις τιμές στην αρχή να είναι 0,04 mg πρωτεΐνης/mL και μετά την HPLC να φτάνουν 0,003 mg πρωτεΐνης/mL, παρατηρώντας πως η αντιυπερτασική δράση στο τέλος παρουσιάστηκε 13 φορές πιο ισχυρή και επισημαίνοντας πως τα μικρά και πιο υδροφοβικά πεπτίδια είναι υπεύθυνα για την ανασταλτική δράση του ACE (Vermeirssen, Van Camp and Verstraete, 2005).

Σε έρευνα των Mansinhahai επισημάνθηκαν υψηλά επίπεδα ανασταλτικής δραστηριότητας του ACE για το WP που προέκυψε μετά από ενζυμική υδρόλυση με αλκαλάση. Δημιουργήθηκαν 4 κλάσματα (>10, <10,>3, <3 kDa) με RP-HPLC, με τη

μεγαλύτερη αντιυπερτασική δράση να σημειώνεται για το κλάσμα >10 kDa (Mansinhbhai *et al.*, 2022). Οι Baba *et al.* μελέτησαν την ανασταλτική δράση του ACE σε γάλα καμήλας πριν και μετά την ενζυμική υδρόλυση με πεψίνη κάτω από διαφορετικές συνθήκες υδρόλυσης [συγκέντρωση ενζύμου (0,5, 1 και 2 %), θερμοκρασία επώασης (30°, 37° και 45° C) και χρόνος υδρόλυσης (120, 240 και 360 λεπτά)]. Οι τιμές IC₅₀ για το γάλα καμήλας ήταν 3,6 mg/mL, ενώ τα ποσοστά μετά την υδρόλυση μειώθηκαν σημαντικά ανεξάρτητα από τις διαφορετικές συνθήκες που αναφέρθηκαν, με εύρος που κυμάνθηκε από 0,2-1,3 mg/mL (Baba *et al.*, 2021). Οι Costa *et al.* μελέτησαν την επίδραση της θέρμανσης (65° C και 95° C) και της ενζυμικής υδρόλυσης (αλκαλάση, χυμοτροψίνη και Proteomix) στο αντιυπερτασικό δυναμικό του WPI, με την επίδραση του ενζύμου και της θερμοκρασίας να παίζουν καθοριστικό ρόλο. Κατά την υδρόλυση του WPI με χυμοτροψίνη στους 65° C η IC₅₀ ήταν 0,05 mg/mL και παρουσίασε περίπου 10 φορές πιο ισχυρή δράση από τα υπόλοιπα δύο ένζυμα στην ίδια θερμοκρασία. Σημειώθηκε επίσης πως η αυξημένη θερμοκρασία υδρόλυσης δεν επηρέασε τις τιμές IC₅₀ σε σχέση με τη μη υδρολυμένα WPI (Lourenço da Costa, Antonio da Rocha Gontijo and Netto, 2007). Οι Tavares *et al.* σημείωσαν αυξημένη ανασταλτική δράση για WPC μετά από υδρόλυση με εκχύλισμα του *C.cardunculus* με το IC₅₀ να είναι περίπου 0,05 mg/mL και για το κλάσμα <3 kDa να είναι 0,03 mg/mL (Tavares *et al.*, 2011).

Σε έρευνα των Peslerbes αξιολογήθηκε η επίδραση τριών ενζύμων (παπαΐνη, βρωμελίνη και φικίνη), με ποικίλο pH, αναλογία ενζύμου προς υπόστρωμα και χρόνο υδρόλυσης στην παρασκευή WPC υδρολυμάτων και του κλάσματος <3 kDa για τον προσδιορισμό των αντιυπερτασικών ιδιοτήτων, με αποτελέσματα που δεν ήταν σαφή για μεγαλύτερη επίδραση κάποιου από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε *in vitro* πέψη συγκεκριμένων υδρολυμάτων, με τις αντιυπερτασικές δράσεις των υδρολυμάτων παπαΐνης και βρωμελίνης να είναι αυξημένες μετά την πέψη, με ακόμη μεγαλύτερη δράση να υπάρχει για το κλάσμα <3 kDa (Peslerbes *et al.*, 2022).

Η ζύμωση με διάφορους μικροοργανισμούς επίσης επηρεάζει θετικά την αντιυπερτασική δράση κυρίως εξαιτίας των βιοενεργών πεπτιδίων που απελευθερώνονται από τις αρχικές πρωτεΐνες. Η έρευνα των Tsai αναφέρει αυξημένη αναστολή του ACE κατά την πάροδο της υδρόλυσης γάλακτος (συνολικά 5 ώρες) που πραγματοποιήθηκε με δύο οξυγαλακτικά βακτήρια (*S.thermophilus*, *L.bulgaricus*) και εκφράστηκε με τη μείωση του IC₅₀ από 0,7 σε 0,3 mg/mL (Tsai *et al.*, 2008). Ακόμη μία έρευνα ανέφερε τη σημαντικότητα της ζύμωσης για την απελευθέρωση

αντιυπερτασικής δράσης, μελετώντας την επίδραση της ζύμωσης 32 διαφορετικών μικροοργανισμών σε αίγιο τυρόγαλα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με τους μικροοργανισμούς *Kluyveromyces marxianus* και *Lactobacillus rhamnosus* ήταν ικανοί να απελευθερώσουν βιοενεργά πεπτίδια με ACE ανασταλτική δράση (Hamme *et al.*, 2009). Επίσης, σε μελέτη των Leclerc *et al.* επισημαίνεται η ανασταλτική δράση του ACE, ανάμεσα σε μη ζυμωμένο γάλα και σε γάλα που έχει υποβληθεί σε ζύμωση με *L.helveticus* R211, *L.helveticus* R389 ή συνδυασμό αυτών με διαφορετικά υποστρώματα (12% σκόνη άπαχου γάλακτος, 10% σκόνη άπαχου γάλακτος σε συνδυασμό με 5% καζεϊνικό νάτριο και 10% σκόνη άπαχου γάλακτος με 5% WPI). Η IC₅₀ είναι αυξημένη σε όλες τις περιπτώσεις για το μη ζυμωμένο γάλα και βαίνει μειούμενη για το γάλα μετά τη ζύμωση, με τις χαμηλότερες τιμές να εντοπίζονται για το καζεϊνικό υπόστρωμα (Leclerc *et al.*, 2002). Σε μελέτη των Manzano *et al.* χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τυρογάλακτος κατά την παραγωγή φρέσκου, μη παστεριωμένου τυριού από μικρό παραδοσιακό τυροκομείο στο Μεξικό αφού είχε προηγηθεί κλασμάτωση (πεπτίδια < 10 kDa) και αξιολογήθηκε η ACE ανασταλτική δράση έπειτα από μικροβιακή ζύμωση που γίνεται από τον εγγενή μικροβιακό πληθυσμό. Παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης αυτής από 22% για το τυρόγαλα πριν τη ζύμωση, με μέγιστη ACE ανασταλτική δραστηριότητα να παρουσιάζεται για δείγματα τυρογάλακτος που υποβλήθηκαν σε 10 ώρες ζύμωσης, πιστεύοντας πως η παρουσία συγκεκριμένων οξυγαλακτικών στελεχών στο τυρόγαλα να καταφέρνει να απελευθερώνει βιοενεργά πεπτίδια (Mazorra-Manzano *et al.*, 2020). Μελέτη των Ayyash επικεντρώθηκε στη ζύμωση αποβουτυρωμένου γάλακτος καμήλας και αγελάδας με δύο προβιοτικά στελέχη από καμήλα [*Lactococcus lactis* (Lc.K782) και *Lactobacillus acidophilus* (La.DSM)] για την αξιολόγηση της αναστολής του ACE κατά την περίοδο αποθήκευσης τριών εβδομάδων. Το γάλα καμήλας που είχε υποβληθεί σε ζύμωση με Lc.K782 είχε σημαντικά υψηλότερη αναστολή του ACE από το γάλα αγελάδας, ανεξαρτήτως της περιόδου αποθήκευσης. Μία ακόμη παρατήρηση ήταν πως η αναστολή του ACE στο ζυμωμένο γάλα αγελάδας δεν ξεπέρασε το 50%, σε καμία από τις δύο ζυμώσεις καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης (Ayyash *et al.*, 2018).

Ωστόσο, η συμπεριφορά των ζυμωμένων προϊόντων ως προς την αντιυπερτασική τους δράση είναι πιθανό να διαφοροποιηθεί μετά από *in vitro* προσομοίωση πέψης. Η έρευνα των Heddal *et al.* μελετώντας την επίδραση της ζύμωσης με τρία διαφορετικά στελέχη *Streptococcus thermophilus* (RBC6, RBC20 και RBN16) του WPC μετά από *in vitro* πέψη, σημείωσε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ανασταλτική δράση μετά την πέψη σημειώθηκε για το WPC που είχε ζυμωθεί με το

στέλεχος RBC6, με IC₅₀ να είναι περίπου 0,25 μmol πεπτιδίων/mL, ακολούθησε το WPC 0,55 μmol πεπτιδίων/mL και τέλος τα άλλα δύο WPC που είχαν υποβληθεί σε ζύμωση με RBC20 και RBN16 χωρίς να διαφέρουν μεταξύ τους (H. Ye *et al.*, 2022). Οι Alvarado *et al.* απομόνωσαν και ενθυλάκωσαν σε τρία διαφορετικά σύνθετα υλικά το προϊόν υδρόλυσης του WPC που υποβλήθηκε σε κλασματοποίηση για την εκτίμηση της αντιυπερτασικής δράσης. Παρατηρήθηκε πως η ACE ανασταλτική δράση για το υδρόλυμα WPC ήταν περίπου 45% ενώ για τα υπόλοιπα πεπτιδικά κλάσματα παρουσίασε αύξηση σημειώνοντας 55%-80%. Επιπρόσθετα, ήταν ανάλογη η σχέση της ικανότητας ενθυλάκωσης με την ανασταλτική δραστηριότητά του ACE. Όσον αφορά την αντιυπερτασική δράση του WPC μέσα στις κάψουλες αλιγινικού αραβικού κόμμεος μετά τη διαδικασία πέψης παρουσιάστηκε αυξημένη σε σχέση με την αρχική (Alvarado *et al.*, 2019).

Αναφορικά με την επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του γάλακτος, στην παρούσα διατριβή υπήρχε στατιστικώς σημαντική αύξηση για SW-D-P3 για την περιφέρεια της Δυτικής Ελλάδος και Θεσσαλίας. Ομοίως, η μελέτη των Abedin *et al.* επικεντρώθηκε στην ACE ανασταλτική δράση του σκληρού τυριού *chhurpi* που προέρχεται από γάλα αγελάδας και γιακ στις περιοχές Sikkim των Ιμαλαΐων πριν και μετά την *in vitro* πέψη. Σημειώθηκε αύξηση της ανασταλτικής δράσης μετά την πέψη των τυριών, τόσο για τυρί με γάλα αγελάδας όσο και γιακ (Abedin *et al.*, 2022). Διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί σε παραδοσιακά τυροκομικά προϊόντα (τσένταρ, μοτσαρέλα, γκοργκοντζόλα) και στην αυξημένη παρουσία ανασταλτικών πεπτιδίων ACE (Rai, Sanjukta and Jeyaram, 2017). Υπάρχει εκτεταμένη ανασκόπηση για παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή πεπτιδίων με ACE ανασταλτική δράση τόσο για το γάλα όσο και για διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και υποπροϊόντα. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες *in vivo*, σε κλινικές δοκιμές ζώων και κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, αναφέροντας τη μείωση της αρτηριακής πίεσης ως κύριο αποτέλεσμα της επίδρασης των γαλακτοκομικών προϊόντων με ή χωρίς την προθήκη αντιυπερτασικών πεπτιδίων (López-Fandiño, Otte and van Camp, 2006b; Rai, Sanjukta and Jeyaram, 2017). Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για την εύρεση νέων αντιυπερτασικών πεπτιδίων από γαλακτοκομικά προϊόντα (Hernández-Ledesma, Miralles, *et al.*, 2005; Quirós *et al.*, 2007; Hernández-Ledesma, del Mar Contreras and Recio, 2011). Τα IPP και VPP είναι δύο ισχυρά αντιυπερτασικά τριπεπτίδια που έχουν αξιολογηθεί *in vitro* αλλά και *in vivo* (Haque, Chand and Kapila, 2009). Αν και φαίνεται εύλογο ότι τα πεπτίδια IPP και VPP κατά την κατανάλωση γαλακτοκομικών τροφίμων μπορεί να συμβάλλουν, τουλάχιστον εν μέρει προς όφελος του καρδιαγγειακού συστήματος και στο μειωμένο κίνδυνο υπέρτασης, όπως φαίνεται στις συστηματικές

ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από το 1996 ως το 2012, σημειώνονται σημαντικά ερευνητικά κενά (Auestad and Layman, 2021). Η επιτροπή οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι παρά το γεγονός του επαρκούς χαρακτηρισμού των IPP και VPP, δεν είναι εφικτό να υποστηριχθεί σχέση αίτιου και αποτελέσματος μεταξύ της κατανάλωσης IPP και VPP και του ισχυριζόμενου οφέλους για τη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης στο γενικό πληθυσμό (Panel and Nda, 2011).

Στο τελευταίο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, τυρογάλακτος και ΟΟΓ, με τέσσερις βιοχημικές μεθόδους (ORAC, ABTS, FRAP και P-FRAP) πριν και μετά την προσομοίωση *in vitro* γαστρεντερική πέψη. Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των D-P3 σε επίπεδο κυττάρου με τη βοήθεια διεγερμένων κυττάρων HT-29 με H₂O₂ και παράλληλα διερευνήθηκαν και τα επίπεδα mRNA των *NFE2L2*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT* σε THP-1 μακροφάγα και σε διεγερμένα με LPS μακροφάγα της ίδιας κυτταρικής σειράς μετά από 1 ημέρα έκθεση σε D-P3.

Πρόσφατη έρευνα των Sik *et al.* ασχολήθηκε με το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο γάλακτος, γαλακτοκομικών προϊόντων (ρικότα και κότατζ) και υποπροϊόντων [γλυκό και όξινο τυρόγαλα (μετά την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος)] βόειας και αίγειας προέλευσης. Αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο FRAP παρουσιάστηκαν για το αγελαδινό γάλα, ανεξαρτήτως φυλής, σε σχέση με το αίγαιο γάλα, σε αντίθεση με το τυρόγαλα αίγειας προέλευσης που παρουσίασε τα υψηλότερα όλων επίπεδα (Sik *et al.*, 2023), ενισχύοντας το πόσο σημαντικό είναι τόσο το γαλακτοκομικό προϊόν που μελετάται αλλά και η ζωική προέλευση της αρχικής ύλης, δηλαδή του γάλακτος στην προκειμένη. Ομοίως, σε έρευνα των Simos *et al.* μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης (αίγαιο, αγελαδινό και γαϊδούρας) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Το γάλα που προερχόταν από τη φυλή *Capra prisca*, αυτόχθονη ελληνική φυλή αίγας, παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές τόσο στην *in vitro* μελέτη όσο και στην *in vivo* μελέτη, υποθέτοντας πως οφειλόταν στη θετική επίδραση των φυσικών βοσκοτόπων (Simos *et al.*, 2011). Το γάλα με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα έχει ταυτόχρονα και καλύτερη οξειδωτική σταθερότητα. Ακόμη μία μελέτη πραγματοποίησε σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης του γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων. Πιο αναλυτικά, οι Poronic αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού του γάλακτος και των CN σε αίγαιο, πρόβειο, αγελαδινό και γάλα γαϊδούρας πριν και μετά από *in vitro* προσομοίωση πέψης με τις μεθόδους FRAP και DPPH. Πριν την πέψη, μόνο το γάλα γαϊδούρας παρουσίασε υψηλές τιμές (περίπου 93%) για DPPH, αναφέροντας πως

πιθανόν το γάλα γαϊδούρας να είναι πλούσιο σε συστατικά που να περιέχουν ομάδες υδροξυλίου (-OH), καθώς η δραστηριότητα δέσμευσης ριζών καθορίζεται από τον αριθμό και το πρότυπο υποκατάστασης των ομάδων -OH. Μία ακόμη παρατήρηση είναι η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την γαστρική πέψη, με ακόμη μεγαλύτερη αύξηση να παρουσιάζεται μετά και από την εντερική πέψη (Bučević-Popović *et al.*, 2014).

Μελέτη των Meira *et al.* αξιολόγησε το αντιοξειδωτικό δυναμικό διαφορετικών τυριών πρόβειας προέλευσης από τη Βραζιλία και την Ουρουγιά που είχαν παρασκευαστεί κάτω από διαφορετικές συνθήκες κατά την τυροκόμηση και με διακριτούς χρόνους ωρίμανσης. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό του υδατοδιαλυτού μέρους προερχόμενο από τυρί ροκφόρ έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα ανεξαρτήτως βιοχημικής μεθόδου (Meira *et al.*, 2012).

Σε πρόσφατη μελέτη μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του WPI πριν και μετά από *in vitro* γαστρεντερική πέψη με DPPH, ABTS και ORAC και παρατηρήθηκε διπλάσια αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων μετά την πέψη, ανεξαρτήτως μεθόδου. Αυτό επιβεβαιώνει πως η διάσπαση των πρωτεϊνών και ο σχηματισμός πεπτιδίων ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα του WPI εκθέτοντας τα αμινοξέα ως δότες υδρογόνου που πριν την πέψη «κρύβονταν» στη δομή της πρωτεΐνης. Επίσης, ανέφεραν πως η έκθεση των Caco-2 υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (1 mM H₂O₂ για 3 ώρες) σε αυξανόμενη συγκέντρωση του προϊόντος πέψης WPI για 1 ώρα (0,01-1 mg/mL) ήταν ικανή να περιορίσει τον σχηματισμό των ROS με τρόπο δόσοεξαρτώμενο (de Espindola *et al.*, 2023). Επίσης, σε ακόμη μία μελέτη διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του WPI και των μεμονωμένων πρωτεϊνών (β-Lg, α-La, BSA και Lf) μετά από *in vitro* πέψη σε επίπεδο κυττάρου, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, Caco-2 και HT-29. Σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές δε σημειώθηκε μείωση του σχηματισμού των ROS μετά από έκθεση των κυττάρων σε 0,5 mg/mL WPI για 1 ώρα σε σύγκριση με το BL-D, ενώ οι β-Lg και α-La κατάφεραν να μειώσουν τα επίπεδα ROS. Να αναφερθεί πως στη συγκεκριμένη μελέτη τα κύτταρα εκτέθηκαν σε AAPH (ως οξειδωτικός παράγοντας) (Corrochano *et al.*, 2018a). Οι Piccolomini *et al.* παρουσίασαν αναστολή των ROS και αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο FRAP. Caco-2 κύτταρα εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ για 1 ώρα και επιπλέον 23 ώρες σε WPI μετά από *in vitro* πέψη (0,1-2 mg/mL) και η αντιοξειδωτική δράση ήταν δόσοεξαρτώμενη και για τις δύο μεθόδους (Piccolomini *et al.*, 2012).

Σε ακόμη μία μελέτη αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις προϊόντων που προέρχονται από το γάλα, όπως το WP, η Lf και το βουτυρόγαλα σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5-10 mg/mL,

σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, η Caco-2 ως μοντέλο εντερικού φραγμού και η HepG2 ως ηπατική κυτταρική σειρά ως προς το αντιοξειδωτικό τους δυναμικό. Όλα τα γαλακτοκομικά κλάσματα ανέστρεψαν σημαντικά το οξειδωτικό στρες, όπου προκλήθηκε με 50 μM μεναδιόνης, με το βουτυρόγαλα να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση για τα Caco-2 και η Lf για τα HepG2 (Abad *et al.*, 2023). Ευεργετική δράση της LPX επισημαίνουν οι Matsushita *et al.* μέσω της ανασταλτικής δραστηριότητας της στην έκκριση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL8 και στα επίπεδα έκφρασης mRNA της ίδιας κυτοκίνης σε Caco-2 κύτταρα που βρίσκονται σε οξειδωτικό στρες (Matsushita *et al.*, 2008).

Οι Pinho *et al.* μελέτησαν την κυτταροπροστατευτική δράση αποβουτυρωμένου γάλακτος του εμπορίου, μετά από *in vitro* γαστρεντερική πέψη σε συγκαλλιέργεια Caco-2/HT-29 κύτταρων που είτε έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες (παρουσία H_2O_2) είτε δεν έχουν (απουσία H_2O_2). Σημειώθηκε σημαντική πτώση των επιπέδων ROS στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε γάλα (που είχε προηγηθεί πέψη), ανεξαρτήτως προέλευσης (Pinho *et al.*, 2021).

Σε μελέτη των Simone *et al.* αναλύθηκε η πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση του τυριού ΠΟΠ, Mozzarella di Bufala Campana. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων Caco-2 υπό οξειδωτικές συνθήκες (50 μM H_2O_2 για 30 λεπτά), έδειξε να καταστέλλεται μόνο κατά την έκθεση των κυττάρων σε 1mg/mL τυρόγαλα, αλλά όχι για σε γάλα ή σε όξινο ορό. Η απουσία κυτταροπροστατευτικής δράσης στο βουβαλίσιο γάλα πιθανόν να υποδηλώνει την αυξημένη παραγωγή ειδικών βιοενεργών πεπτιδίων κατά τη διαδικασία παραγωγής του τυριού Mozzarella. Αξίζει να αναφερθεί πως η πρωτεόλυση είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης σειράς γεγονότων λόγω της συνδυασμένης δράσης φυσικών και ενδογενών πρωτεασών του γάλακτος, ενζύμων πήξης γάλακτος, καλλιέργειας εκκίνησης και της πιθανής μολυσματικής μικροχλωρίδας. Κατά την ωρίμανση του τυροπήγματος, ο πολλαπλασιασμός της βακτηριακής μικροχλωρίδας οδηγεί σε ταχεία οξίνιση του ορού γάλακτος και σε μία δευτερογενή πρωτεόλυση εξέχουσας σημασίας όπου εκτελείται από ενδο- και εξω-κυτταρικές πεπτιδάσες και πρωτεϊνάσες. Επίσης αναφέρεται ότι η σύνθεση με πεπτίδια χαμηλής μάζας στο κλάσμα SW ήταν εξαιρετικά ετερογενής, με σημαντικό αριθμό διαφορετικών ολιγοπεπτιδίων. Η επιπρόσθετη θερμική επεξεργασία επηρεάζει και την πεπτιδική σύνθεση του ορού τυρογάλακτος, με ενεργοποίηση ή/και αναστολή τη δράσης των πεπτιδασών και των πρωτεασών, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων με πιθανή δράση συμβαίνει κυρίως σε SW. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται επίσης από τις βιοχημικές αναλύσεις μεταφέρονται σε καλλιέργειες

κυττάρων Caco-2 (De Simone *et al.*, 2009). Οι Cui *et al.* μελέτησαν αρχικά τα πεπτιδικά προφίλ και έπειτα την αντιοξειδωτική δράση εκτεταμένης υδρόλυσης συμπυκνωμένου πρωτεϊνικού γάλακτος (MPC). Τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από από τεχνολογίες ενζυμικής υδρόλυσης έχουν συνήθως μοριακό βάρος 200-2500 Da και αποτελούνται από 2-20 αμινοξέα. Το εκτεταμένης MPC υδρόλυμα στη συγκεκριμένη έρευνα υπολογίζεται κάτω από 3 kDa, με περισσότερες πληροφορίες να μη δίνονται. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμήθηκε με διάφορες βιοχημικές μεθόδους, όπως η DPPH, ABTS, FRAP και P-FRAP μετά την υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό πρωτεασών με δράση έξω- και ένδοπεπτιδάσες. Παρατηρήθηκε πως υπήρχε ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υδρολύματος MPC με την αντιοξειδωτική δράση και μετά την υδρόλυση παρουσιάστηκαν αυξημένες τιμές, ανεξαρτήτως μεθόδου, σε σύγκριση με το MPC. Τέλος, επισημαίνεται πως τα πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (MW<3kDa) είναι κυρίως υπεύθυνα για την πρόληψη ή τη μείωση οξειδωτικού στρες (Cui *et al.*, 2022).

Επιπρόσθετα, μία ακόμη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Barac *et al.* μελέτησε το πιθανό αντιοξειδωτικό και αντιυπερτασικό δυναμικό παραδοσιακών σερβικών λευκών τυριών αγελαδινής και πρόβειας προέλευσης πριν και μετά από *in vitro* πέψη. Παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης μετά την πέψη, με υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης να παρουσιάζονται για τα πρόβεια τυριά με τη μέθοδο ABTS. Οι τιμές P-FRAP ήταν σταθερές πριν την πέψη και μετά την πέψη παρουσίασαν αύξηση 17,9-99,3 %. Εκτός από την πρωτεόλυση, η απελευθέρωση διάφορων ενώσεων (α -τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, ανόργανα στοιχεία, βιταμίνη E, καροτένιο, πρωτεΐνες του ορού και καζεΐνες) κατά την *in vitro* πέψη θα μπορούσε να είναι ένας από τους λόγους για τη βελτιωμένη και ταυτόχρονα πολύ διαφορετική αναγωγική ισχύ και να είναι εξαρτώμενη από τη διαδικασία της τυροκόμησης. Όσον αφορά τα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP, δεν παρουσίασαν αυξήσεις και στην περίπτωση πρόβειου τυριού Sjenica and Svrlijig ήταν μειωμένες (Barac *et al.*, 2019a).

Οι Tagliazucchi *et al.* μελέτησαν την *in vitro* αντιοξειδωτική δράση πλήρους, ημιαποβουτυρωμένου και αποβουτυρωμένου βόειου γάλακτος κατά την προσομοίωση της γαστρεντερικής πέψης, με αυξημένα επίπεδα TEAC να παρατηρούνται μετά την πέψη ανεξαρτήτως της σύστασης του γάλακτος. Παρατήρησαν πως η αντιοξειδωτική δράση του πλήρους γάλακτος οφειλόταν στο κλάσμα που απαρτιζόταν από συστατικά >3 kg/mol, ενώ του ημιαποβουτυρωμένου και αποβουτυρωμένου στο κλάσμα <3 kg/mol. Τέλος, ανέφερε πως σε επίπεδο πεπτιδίου, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη

θεωρούνται δύο βασικά πεπτίδια υπεύθυνα για την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών (Tagliazucchi *et al.*, 2016).

Μία από τις κύριες διαδικασίες για την παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων είναι η μικροβιακή ζύμωση της πρωτεΐνης, όπως πραγματοποιείται για το γάλα με την προσθήκη πρωτεολυτικών καλλιέργειών εκκίνησης και μη κατά την παρασκευή τυριού ή γιαούρτης (Fitzgerald and Murray, 2006; Korhonen, 2009). Σε μελέτη των Soleymanzadeh *et al.* πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης του ορού του γάλακτος καμήλας με ή χωρίς ζύμωση με *Leuconostoc lactis* και για τα κλάσματα πεπτιδίων 5-10 kDa, 3-5 kDa και <3 kDa μετά τη ζύμωση. Αυξημένα επίπεδα TEAC, τόσο με τη μέθοδο DPPH όσο και με την ABTS σημειώθηκαν μετά την πέψη σε σύγκριση με το γάλα καμήλας που δεν είχε υποστεί μικροβιακή ζύμωση. Επίσης, για DPPH παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα TEAC για το κλάσμα <3kDa, ενώ για τη μέθοδο ABTS σημειώθηκαν μεγαλύτερες τιμές για το κλάσμα 5-10 kDa (Soleymanzadeh *et al.*, 2019). Οι Taha *e al.* μελέτησαν την επίδραση της πρόσθετης ζύμωσης με *L. acidophilus* 20552 ή *L. helveticus* CH5 σε βουβαλίσιο γιαούρτι μαζί με τις εναρκτήριες καλλιέργειες ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση κατά τη διάρκεια 2 εβδομάδων σε συνθήκες συντήρησης. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των γιαουρτιών, παρά μόνο κατά την πάροδο της αποθήκευσης που είχε αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας (Taha *et al.*, 2017).

Ακόμη μία παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων και υποπροϊόντων που προκύπτουν είναι η σύσταση της πυτιάς. Μία μελέτη που επιβεβαίωσε την επίδραση της διαφορετικής προέλευσης της πυτιάς είναι αυτή του Timon *et al.*, όπου συγκρίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα σκληρών τυριών βόειας προέλευσης με τρεις διαφορετικές πυτιές (ζωική, φυτική και μικροβιακή), με τη μικροβιακή πυτιά να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης (Timon *et al.*, 2019).

Οι Yang *et al.* επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση της πιθανούς κυτταροπροστατευτικής δράσης του συνολικού υδατοδιαλυτού μέρους πεπτιδίων και κλασμάτων αυτού (<3 kDa, 3–10 kDa και >10 kDa) από τυρί τσένταρ που είχε ζυμωθεί με το *L. helveticus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα τέσσερα πεπτιδικά κλάσματα ήταν ικανά να αποδυναμώσουν τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας που προκαλείται από το H₂O₂ και να ενισχύσουν την αναστολή ROS που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, με τα μικρότερα επίπεδα ROS να εντοπίζονται για το πεπτιδικό κλάσμα <3 kDa, ενισχύοντας έτσι την κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα (Yang *et al.*, 2023). Σε παρόμοια μελέτη διερευνήθηκε το αντιοξειδωτικό δυναμικό του υδατοδιαλυτού

μέρους προερχόμενο από τυρί τσένταρ τόσο αγελαδινής όσο και βουβαλίσιας προέλευσης κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του τυριού. Πιο αναλυτικά, η αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο ABTS παρουσίασε αύξηση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και κατά την πάροδο της ωρίμανσης, με το βουβαλίσιο να έχει υψηλότερες τιμές, πιθανόν λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού αζώτου που είχε. Επιπρόσθετα, η ενδοκυτταρική παραγωγή ROS σε Caco-2 κύτταρα που εκτέθηκαν σε οξειδωτικό μέσο BHP, σημείωσε στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα μέχρι και τον πέμπτο μήνα ωρίμανσης και έπειτα σταθεροποιήθηκαν (Huma *et al.*, 2018).

Τέλος, αναφορικά με τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση και τα βιοενεργά τους πεπτίδια, υπάρχουν μελέτες που έχουν ασχοληθεί με βιοενεργά πεπτίδια με πολλές διαφορετικές λειτουργίες, τα οποία μπορεί να προτιμώνται έναντι πεπτιδίων μονής δράσης, καθώς ταυτόχρονα είναι ικανά να ενεργοποιήσουν, να ρυθμίσουν ή να αναστείλουν πολλαπλές φυσιολογικές οδούς. Η μελέτη των Toala *et al.* επικεντρώθηκε σε ζυμωμένο γάλα με τέσσερα στελέχη *L.plantarum* και την πιθανή τους δράση (αντιφλεγμονώδης, αντιαιμολυτική, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή) τόσο του ζυμωμένου προϊόντος (μετά από εκχύλιση) όσο και των κλασμάτων αποτελούμενα είτε από πεπτίδια 3-10 kDa είτε από πεπτίδια <3kDa. Πιο συγκεκριμένα για την αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκαν οι τρεις προαναφερθείσες ομάδες με ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης (1,2 mg/mL), με τις μεθόδους ORAC και ABTS, με την αντιοξειδωτική ικανότητα να παρουσιάζει ειδικότητα για κάθε στέλεχος και συνολικά να σημειώνει υψηλότερα επίπεδα για τα γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση (αναφερόμενο ως crude extract) σε σύγκριση με τα δύο πεπτιδικά κλάσματα. Επίσης, ανεξάρτητα από το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση του γάλακτος, οι τιμές TEAC για την ORAC ήταν σημαντικά υψηλότερες για το κλάσμα <3kDa σε σύγκριση με το κλάσμα που αποτελούταν από πεπτίδια 3-10 kDa, ενώ καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε με τη μέθοδο ABTS (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017). Ακόμη μία μελέτη ασχολήθηκε με την αντιοξειδωτική δράση του ορού του γάλακτος κατά τη ζύμωση με 25 διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων και κατέληξε στο συμπέρασμα της επίδρασης της ειδικότητας του στελέχους με την αντιοξειδωτική δράση (Virtanen *et al.*, 2007).

Σε πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του WPI μετά από εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης, πριν και μετά από *in vitro* πέψη με ABTS, DPPH και FRAP, παρατηρώντας τα υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης για το κλάσμα μετά την πέψη και πιο συγκεκριμένα για αυτό που είχε υποστεί πίεση στα 600 MPa για 30 λεπτά. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και για την εφαρμογή WPI στο

κυτταρικό οξειδωτικό μοντέλο Caco-2/H₂O₂, με στατιστικώς σημαντική μείωση της παραγωγής των ROS (Ma *et al.*, 2023).

Οι Xie *et al.* πραγματοποίησαν σύγκριση του αντιοξειδωτικού δυναμικού ανάμεσα σε CN που είχε υποστεί *in vitro* υδρόλυση με αλκαλάση και με CN που είχε υποστεί *in vitro* γαστρεντερική πέψη, με τις μεθόδους ORAC και ABTS καθώς και σε επίπεδο κυττάρου σε διεγερμένα με H₂O₂ κύτταρα HepG2. Το κλάσμα χαμηλού μοριακού βάρους που προέκυψε από την υδρόλυση CN με αλκαλάση άσκησε ισχυρότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση καθώς και ηπατική κυτταροπροστασία έναντι του H₂O₂, σε σύγκριση με το κλάσμα χαμηλού μοριακού βάρους που προέκυψε από τη γαστρεντερική πέψη. Αναφέρεται πως η ενζυμική εξειδίκευση της αλκαλάσης καθώς και τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων είναι πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της πραγματικής αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας *in vivo* (Xie *et al.*, 2013).

Οι μελέτες που επικεντρώνονται στις τεχνολογίες που επιτρέπουν τη μετατροπή τυρογάλακτος, ΟΟΓ ή άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων σε άλλα προϊόντα αυξάνονται συνεχώς, καθώς τέτοιες διεργασίες δυνητικά λειτουργούν τόσο ως στρατηγικές αξιοποίησης όσο και ως πρακτικές διαχείρισης αποβλήτων. Μία από τις διαδικασίες που θα μπορούσαν να προάγουν την αξία του γάλακτος και των διάφορων παραγώγων αυτού, είναι η ενζυμική υδρόλυση, καθώς προάγει την κλασμάτωση των πρωτεϊνών σε βιοενεργά πεπτίδια και συνήθως βελτιώνει κάποια από τις λειτουργικές ιδιότητες όπως είναι η διαλυτότητα, η γαλακτωματοποίηση και η υφή και επομένως ενδέχεται να αυξάνει τη δυνατότητα εφαρμογής των πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε προϊόντα διατροφής. Μελέτη των Correia *et al.* αξιολόγησε τα προϊόντα υδρόλυσης πρόβειου τυρογάλακτος χρησιμοποιώντας την πρωτεάση προερχόμενη από τον *Bacillus sp.* P7 ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, αναφέροντας σημαντική αύξηση με τη μέθοδο ABTS αναλόγως του χρόνου υδρόλυσης, με τη μεγαλύτερα επίπεδα να παρουσιάζονται στις 6 ώρες, ενώ για FRAP στις 3 ώρες και P-FRAP στη 1 ώρα (Correia *et al.*, 2014).

Σε μελέτη των Kleekayai *et al.* αξιολογήθηκε το αντιοξειδωτικό δυναμικό του WPC μετά από ενζυμική υδρόλυση με δύο διαφορετικά ένζυμα υπό συνθήκες ελεγχόμενου pH ή μη. Σημειώθηκε αντιοξειδωτική δράση τόσο με τη χρήση των βιοχημικών μεθόδων ORAC και TEAC, όσο και με τη χρήση της κυτταρικής σειράς HepG2 υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (AAPH και H₂O₂). Ωστόσο, η επίδραση των συνθηκών υδρόλυσης ήταν πιο έντονη στις *in vitro* βιοχημικές μεθόδους σε σύγκριση με την κυτταρική αντιοξειδωτική ανάλυση (Kleekayai *et al.*, 2020).

Είναι γνωστό πως το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους κρίσιμους παθογόνους παράγοντες τόσο στην εξέλιξη της γήρανσης όσο και των χρόνιων νοσημάτων, όπως είναι ο καρκίνος, η φλεγμονή του μυοκαρδίου και ο διαβήτης. Οι ινοβλάστες είναι ο κύριος τύπος κυττάρων του χόριου του δέρματος και επομένως είναι κρίσιμος ο ρόλος τους στην προστασία από την ανάπτυξη παθοφυσιολογικών καταστάσεων του δέρματος. Για αυτό είναι καθοριστικής σημασίας η διερεύνηση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων συνολικά σε διαφορετικά *in vitro* μοντέλα, που να είναι κατάλληλα για τον παράγοντα μελέτης. Έχει αναφερθεί σε μελέτη πως το πεπτίδιο VLPVPQK (30-500 ng/mL) που προέρχεται από καζεΐνη βουβάλου, μπορεί να καταπολεμήσει την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από 0,2 mM H₂O₂ σε ινοβλάστες, αφού είχε επιβεβαιωθεί η αντιοξειδωτική του δράση με ABTS και ORAC (Devi *et al.*, 2017).

Ένα *in vitro* πρότυπο μελέτης του νευρικού συστήματος αποτελεί η κυτταρική σειρά PC12, που περιλαμβάνει κύτταρα από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου. Οι Jin *et al.* ανέφεραν πως μετά από ενζυμική υδρόλυση WP με πεψίνη και τρυψίνη και έκθεσή τους σε PC12 κύτταρα που βρίσκονταν σε οξειδωτικό στρες λόγω έκθεσης σε H₂O₂, ήταν ικανό το υδρόλυμα να μειώσει την οξειδωτική βλάβη των κυττάρων, αυξάνοντας τους τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα και αντιοξειδωτικούς δείκτες SOD, CAT και περιορίζοντας την παραγωγή των ROS (Jin *et al.*, 2013).

Στη μελέτη των Nassar *et al.* χρησιμοποιήθηκαν υδρολύματα πρωτεϊνών από πρόβειο ορό γάλακτος (από διαφορετικά χρονικά σημεία υδρόλυσης) και εκτέθηκαν σε ένα ευκαρυωτικό μοντέλο (κύτταρα ζύμης *S.cerevisiae*) που είχαν υποστεί οξειδωτικό στρες (4 mM H₂O₂ για 48 ώρες) και διαπιστώθηκε πως όλα τα υδρολύματα εμφάνισαν σημαντική βελτίωση στο ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, με τον αυξημένο χρόνο υδρόλυσης να φαίνεται πως παράγει υδρολύματα με υψηλότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Nassar *et al.*, 2022).

Ακόμη μία έρευνα που ασχολήθηκε με την αντιοξειδωτική δράση του WPC, πριν και μετά από ενζυμική υδρόλυση με τρυψίνη καθώς και του κλάσματος με μικρά πεπτίδια (<3 kDa), είναι αυτή των Ballatore *et al.* Αρχικά μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση με βιοχημικές μεθόδους, παρατηρώντας 4 και 1,3 φορές πιο αυξημένα επίπεδα TEAC του υδρολυμένου WPC και <3 kDa, αντίστοιχα, σε σχέση με το αρχικό WPC. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι το WPC περιέχει μια σειρά από πρωτεΐνες με αντιοξειδωτική δράση, όπως η Lf και οι Igs, εκτός από τα πεπτίδια και η αντιοξειδωτική δράση που παρατηρείται στο WPH προκύπτει από το συνδυασμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εγγενών συστατικών WPC και των πεπτιδίων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση. Έπειτα, αξιολογήθηκε και η

κυτταροπροστατευτική δράση των κλασμάτων αυτών έναντι της μεναδιόνης, ενός παράγοντα στρες, σε επιθηλιακά κύτταρα του ειλεού από αρουραίο (IEC-18) μόνο με οπτική παρατήρηση, καταλήγοντας πως η ζωτικότητα των κυττάρων βελτιώθηκε μετά την ταυτόχρονη επώαση του οξειδωτικού παράγοντα με WPH και <3 kDa σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο σε μεναδιόνη (Ballatore *et al.*, 2020). Σε μελέτη των Pepe *et al.* διερευνήθηκε η κυτταροπροστατευτική δράση του μαλακού τυριού Stracchino από αγελαδινό γάλα, Ιταλικής προελεύσεως μετά από *in vitro* γαστρεντερική πέψη σε φυσιολογικά κύτταρα εντερικής κρύπτης από αρουραίους (IEC-6) που είχαν υποβληθεί σε H₂O₂. Δύο εξαπεπτίδια που εντοπίστηκαν σε αφθονία στο κλάσμα της β-CN, τα EAMAPK και AVPYRQ, συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν στα IEC-6 κύτταρα, παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική δράση σε εύρος 5–150 μg/mL, σημειώνοντας αναστολή των ROS και αύξηση των SOD και Nrf2 (Pepe *et al.*, 2016).

Σε μελέτη των Liu *et al.* πραγματοποιήθηκε *in vitro* ενζυμική υδρόλυση CN και έπειτα από καθαρισμό και ταυτοποίηση των πεπτιδίων, εντοπίστηκε ένα πενταπεπτίδιο (LHSMK) που δεν είχε αναφερθεί σε άλλες μελέτες, το οποίο και μελετήθηκε εις βάθος. Το LHSMK παρουσίασε αναγωγική ικανότητα, μέσω DPPH και P-FRAP καθώς επίσης και ικανότητα αναστολής των ROS μέσω χρήσης της κυτταρικής σειράς Caco-2 και οξειδωτικό παράγοντα το H₂O₂ (Liu *et al.*, 2021).

Από φυσιολογική άποψη, ο εμπλουτισμός των τροφίμων με αντιοξειδωτικά πεπτίδια πιθανόν να εξαρτάται και από την αντίσταση των πεπτιδίων κατά τη διαδικασία της πέψης. Είναι γνωστό πως η α-La είναι η δεύτερη κύρια πρωτεΐνη του βόειου ορού του γάλακτος και η πλήρης ή μερική υδρόλυση της μπορεί να παράγει φυσικά πεπτίδια με δυνητικά βιολογικές δράσεις, ανάμεσα σε αυτές, ανήκει και η αντιοξειδωτική δράση. Οι Sadat *et al.* μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση της α-La και των πεπτιδίων που προέκυψαν μετά από την ενζυμική της υδρόλυση με θερμολυσίνη στους 70 °C με την ABTS, παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα της αντιοξειδωτικής δράσης της υδρολυμένης α-La σε σχέση με το Trolox καθώς επίσης επισήμαναν και την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αμινοξέος τυροσίνης ή τρυπτοφάνης και στα πέντε πεπτίδια που παρουσίασαν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Sadat *et al.*, 2011). Σε έρευνα των Topolo *et al.* διερευνήθηκε η πιθανή προστατευτική δράση τεσσάρων συνθετικών πεπτιδίων (NPYVPR, AVPYRQR, KVLVPVEK, and ARHHPHLSFM) που προέρχονται από το γάλα έναντι του οξειδωτικού στρες που έχει προκληθεί σε Caco-2 κύτταρα παρουσία H₂O₂ ή t-BOOH. Η έκθεση 50 μg/mL των τεσσάρων αυτών πεπτιδίων για 23 ώρες παρουσία 250 μM t-BOOH έδειξαν αναστολή παραγωγής των

ROS σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί μόνο στον οξειδωτικό παράγοντα (Tonolo *et al.*, 2018).

Εκτός από την *in vitro* μελέτη εμπλουτισμού των τροφίμων με πεπτίδια για την αύξηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού, η δημιουργία νέων προϊόντων με βάση τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα είναι υπό μελέτη τα τελευταία χρόνια. Αναλυτικότερα, ένας αποτελεσματικός τρόπος για την επαναχρησιμοποίηση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων είναι η προσθήκη αυτών σε κάποιο τρόφιμο ή αφέψημα, που την ίδια στιγμή μειώνει τους περιβαλλοντικούς ρύπους και ίσως να έχει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Μία προσπάθεια που στηρίζεται πάνω σε αυτή τη λογική εξέτασαν οι García-Casas με ένα αφέψημα Colada με βάση το τυρόγαλα. Πιο συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του αφεψημάτος Colada πριν και μετά την *in vitro* πέψη με τις βιοχημικές μεθόδους ABTS, DPPH και FRAP καθώς και η κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα με τα Caco-2 κύτταρα, υπό κανονικές συνθήκες και υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες με την προσθήκη t-BOOH. Η αντιοξειδωτική δράση, ανεξάρτητα από τη βιοχημική μέθοδο, παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αύξηση μετά την πέψη. Επίσης, τα επίπεδα ROS ήταν μειωμένα σε επίπεδο κυττάρου τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό συνθήκες στρες μετά την επώαση του προϊόντος πέψης του αφεψημάτος σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί στο προϊόν πέψης (García-Casas *et al.*, 2022). Μία ακόμη μελέτη αναφέρει αυξημένη αντιοξειδωτική δράση και υψηλό ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών, διάφορων αφεψημάτων φρούτων και λαχανικών που έχουν ως βάση το τυρόγαλα (Purkiewicz and Pietrzak-Fiećko, 2021). Η προθήκη ΟΟΓ ως «μαρινάρισμα» σε μη ωριμασμένο ψητό βόειο κρέας είναι μία ακόμη μελέτη που ασχολήθηκε με την προσθήκη γαλακτοκομικού υποπροϊόντος σε τρόφιμο. Μελετήθηκε η οξείδωση λιπιδίων-πρωτεϊνών που είναι μια σημαντική διαδικασία υποβάθμισης της ποιότητας του κρέατος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διάφορα προϊόντα διάσπασης, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τα πεπτίδια που απελευθερώνονται και κατά συνέπεια τη βελτίωση του αντιοξειδωτικού δυναμικού του προϊόντος (Wójciak *et al.*, 2018).

Οι *in vivo* και κλινικές μελέτες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της αντιοξειδωτικής δράσης των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων ως συμπλήρωμα στη διατροφή του ανθρώπου και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι Ribi *et al.* ασχολήθηκαν με την προθήκη σκόνης τυρογάλακτος (10 g/kg ζώντος βάρους) σε σιτηρέσιο μόνη της και σε συνδυασμό με σκόνη χαρουπιού (5 g/kg από το καθένα) σε κόνικλους κατά το στάδιο του απογαλακτισμού τους. Τα πρόσθετα φαίνεται να επηρέασαν θετικά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και τα επίπεδα SOD και

CAT σε διάφορους ιστούς, σε σχέση με το βασικό σιτηρέσιο των κονίκλων (Rtibi *et al.*, 2021). Οι Vatani *et al.* μελέτησαν το αντιοξειδωτικό δυναμικό του εμπορικού σκευάσματος WP από την εταιρία Rooyan σε δείγμα 30 ενήλικων υπέρβαρων ανδρών και ανέφεραν πως η ομάδα που είχε λάβει WP σε σχέση με την ομάδα που δεν είχε λάβει το σκεύασμα, παρουσίασε αυξημένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και γλουταθειόνης στο αίμα (Sheikholeslami Vatani and Ahmadi Kani Golzar, 2012).

Οι Revilla *et al.* ανέλυσαν 224 δείγματα τυριού από αγελαδινό, αίγαιο και πρόβειο γάλα, ωρίμανσης άνω των 6 μηνών και κατά τη διάρκεια δύο εποχών ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο ABTS. Παρατήρησαν ότι η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα είχε σημαντική συσχέτιση με την εποχικότητα της παρασκευής του τυριού και τον χρόνο ωρίμανσης, αλλά όχι με τη ζωική προέλευση του γάλακτος. Επισημάνθηκε πως η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν υψηλότερη στα δείγματα του καλοκαιριού σε σύγκριση με αυτά του χειμώνα. Αυτή η διαφορά ίσως οφείλεται στη χαμηλότερη αναλογία υδρόφοβων:υδρόφιλων πεπτιδίων στα καλοκαιρινά δείγματα σε σχέση με τα χειμερινά τυριά, ειδικά μετά τον πρώτο μήνα ωρίμανσης, υποδηλώνοντας ισχυρή πρωτεόλυση (Revilla *et al.*, 2016).

Οι Corrochano *et al.* παρατήρησαν στατιστικώς σημαντική μείωση στη γονιδιακή έκφραση των SOD1 και CAT σε Caco-2 κύτταρα έπειτα από 4 ώρες έκθεσης WPI σε σύγκριση με το BL-D. Ωστόσο, μόνο για το BSA δε σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δύο αυτά γονίδια (Corrochano *et al.*, 2018b). Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η ικανότητα ελέγχου της γαστρεντερικής πέψης να ρυθμίζει τα επίπεδα mRNA των SOD1, CAT και γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί με την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων από ενδογενή ένζυμα που ρυθμίζουν τη λειτουργία του εντέρου (Dave *et al.*, 2016). Η δραστηριότητα του ενζύμου CAT ήταν σε υψηλότερα επίπεδα σε HUVECs κύτταρα (ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας) μετά από 48 ώρες έκθεσης σε κλάσματα χαμηλού μοριακού βάρους (< 5 kDa) υδρολυμάτων ορού γάλακτος που παράγονται από διαφορετικά εμπορικά ένζυμα (O'Keeffe and FitzGerald, 2014). Οι Zhao *et al.* αξιολόγησαν την αντιφλεγμονώδη δράση της βανιλίνης και της αρωματικής ένωσης 4-μεθυλγλουαιακόλης σε εύρος συγκεντρώσεων σε THP-1 διεγερμένα (1 μg/mL LPS για 23 ώρες) κύτταρα παρατήρησαν τη βελτίωση της γονιδιακής έκφρασης των NrF2 και HMOX1 (Zhao *et al.*, 2019). Έρευνα των Kaulmann *et al.* πραγματοποίησε δοκιμές σε τριπλή καλλιέργεια κυττάρων (Caco-2/HT-29-MTX (90:10) συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σειράς THP-1). Μετά τη διέγερση των κυττάρων με LPS, TNFA και IL1β (για πρόκληση φλεγμονής), τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες ποικιλίες

δαμάσκηνου και λάχανου, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε *in vitro* γαστρεντερική πέψη και μελετήθηκαν διάφορα γονίδια, μεταξύ αυτών και το NRF2, ως παράγοντας οξειδωτικού στρες, όπου σημειώθηκε μειωμένη έκφραση του γονιδίου αυτού (Kaulmann *et al.*, 2016). Οι Conte *et al.* (2022) μελέτησαν την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση βραζιλιάνικης πρόπολης (50 µg/mL) σε διεγερμένα THP-1 (1 µg/mL LPS για 24 ώρες) και παρατήρησαν πως η πρόπολη προκάλεσε σημαντικά υψηλότερη έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου HMOX1 (Conte *et al.*, 2022). Σε έρευνα των Speranza *et al.* (2010) αξιολογήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση ενός αυτοφυούς βοτάνου σε THP-1 ενεργοποιημένα (10 µg/mL LPS για 24 ώρες) μακροφάγα και παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων iNOS, CAT και SOD (Speranza *et al.*, 2010).

Στην παρούσα διατριβή τα αποτελέσματα της έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων NFE2L2, HMOX1, SOD1 και CAT δεν επέδειξε σαφή αποτελέσματα για το τυρόγαλα. Πιο συγκεκριμένα, σε THP-1 μακροφάγα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA για τα γονίδια *NFE2L2*, *HMOX1*, *SOD1* και *CAT* για πρόβειο SW-D-P3 σε σχέση με το BL-D-P3, ενώ στα ενεργοποιημένα μακροφάγα άλλαξε η κατάσταση παρατηρώντας αυξημένα επίπεδα mRNA για *CAT* και για τα υπόλοιπα γονίδια καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε. Επίσης, στα μακροφάγα THP-1 παρατηρήθηκε μείωση της γονιδιακής έκφρασης *NFE2L2* για αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο, όχι όμως για το αιγοπρόβειο. Στα αποτελέσματα που αφορούσαν τον ΟΟΓ, τα επίπεδα mRNA δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά για τα γονίδια *NRF2*, *HMOX1* και *SOD1* και σε THP-1 μακροφάγα, ανεξάρτητα της ζωικής προέλευσης του AW-D-P3, με τη μόνη διαφορά να παρατηρείται για το *CAT* που παρουσίασε μείωση σε σύγκριση με το BL-D-P3. Στα ενεργοποιημένα μακροφάγα, η κατάσταση ήταν λίγο διαφορετική με κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια να μην παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική αλλαγή της έκφρασής τους σε σχέση με το BL-D-P3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η έννοια των «λειτουργικών» προϊόντων διατροφής ξεκίνησε πριν από 2.500 χρόνια, όταν ο πατέρας της ιατρικής, Ιπποκράτης, έγραφε το δόγμα «Φάρμακο ας γίνει η τροφή σας και η τροφή σας ας γίνει το φάρμακό σας», πιστεύοντας πως η ισορροπημένη διατροφή είναι το παν για την ανθρώπινη υγεία. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε μία ενδεδειγμένη έρευνα των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων, τυρογάλακτος και όξινου ορού γιαούρτης που συλλέχθηκαν από περιφέρειες της ηπειρωτικής Ελλάδας, και είχε ως στόχο την εύρεση βιολειτουργικών ιδιοτήτων, με έμφαση στις ανοσορυθμιστικές, αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Στηριζόμενη στα αποτελέσματα της διατριβής, θεωρώ πως θα ήταν σκόπιμη η αξιοποίηση του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ σε μεγαλύτερο βαθμό, τόσο για τη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων όσο και ζωοτροφών, καθώς επέδειξαν ευεργετικές δράσεις. Η *in vitro* γαστρεντερική πέψη είχε θετική επίδραση στη διάσπαση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων που με τη σειρά τους επέδειξαν βιολειτουργικές ιδιότητες. Συνολικά, τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα πρόβειας προέλευσης παρουσίασαν μία σχετική υπεροχή *in vitro* ως προς τις αντιυπερτασικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα γαλακτοκομικά υποπροϊόντα αγελαδινής ή αίγειας προέλευσης γάλακτος και παράλληλα ανέδειξαν και μία πιο ισχυρή ανοσορυθμιστική δράση. Αναφορικά με την επίδραση των παραγόντων της γεωγραφικής προέλευσης και εποχικότητας θα ήταν σκόπιμη μία μελλοντική, πιο στοχευμένη προσέγγιση για την εύρεση και άλλων πιθανών βιολειτουργικών επιδράσεων που επιδεικνύουν τα γαλακτοκομικά αυτά υποπροϊόντα.

Επίσης, ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, αξίζει να σημειωθεί πως κρίνεται απαραίτητη η εκτενέστερη έρευνα για την επιβεβαίωση των παρατηρούμενων αυτών διαφορών. *In vivo* μελέτες σε ζώα ή κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβεβαίωση των ευρημάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη. Εν κατακλείδι, περαιτέρω μελέτη είναι αναγκαία για τον προσδιορισμό πεπτιδικών αλληλουχιών, κρυπτογραφημένων εντός της μητρικής πρωτεϊνικής αλληλουχίας, δηλαδή των βιονεργών θραυσμάτων με πιθανή ανοσορυθμιστική, αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική δράση ή πλειοτροπική δράση και *in vivo*.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ συνοπτικά στους μελλοντικούς ερευνητικούς μου στόχους που αφορούν τη μελέτη των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων με μία διαφορετική προσέγγιση. Θα ήταν χρήσιμο ένα μοντέλο συγκαλλιέργειας (πχ. THP-1/Caco-2 ή/και HT-29/Caco-2) για την επιβεβαίωση των βιολειτουργικών ιδιοτήτων του τυρογάλακτος και του ΟΟΓ σε συνδυασμό με ένα *in vitro* δυναμικό μοντέλο γαστρεντερικής πέψης. Επιπρόσθετα, θα επιθυμούσα να εξετάσω και την επίδραση άλλων πιθανών παραγόντων ως προς την ανοσορυθμιστική, αντιυπερτασική και αντιοξειδωτική δράση γαλακτοκομικών υποπροϊόντων *in vitro*. Μία τελευταία αλλά εξίσου σημαντική προσέγγιση θα ήταν η ελεγχόμενη εργαστηριακή παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, όπως η παρασκευή διαφορετικών σκληρών και ημίσκληρων τυριών και στραγγιστής γιαούρτης και η μετέπειτα αξιολόγηση και σύγκριση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων που θα προκύπτουν. Συλλογιζόμενη τη σύγκριση των γαλακτοκομικών υποπροϊόντων ως προς τις προαναφερθείσες βιολειτουργικές τους ιδιότητες, οι παράγοντες κατά τη διαδικασία παρασκευής και συντήρησής τους, όπως είναι ο διαφορετικός χρόνος ωρίμανσης του κάθε τυριού, οι εναρκτήριες καλλιέργειες που προστίθενται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, η διαφορετική μέθοδος στράγγισης καθώς και ο χρόνος και η θερμοκρασία αποθήκευσης τους, θα ήταν μερικοί από τους παράγοντες που θα ήθελα να αξιολογήσω. Η παραγωγή και η απομόνωση πεπτιδίων από γαλακτοκομικά υποπροϊόντα, αρχικά για τη διερεύνηση του φυσιολογικού τους ρόλου τόσο στο πεπτικό όσο και στο ανοσιακό σύστημα και η επακόλουθη πιθανή προσθήκη τους σε κάποιο τρόφιμο και μελέτη πάνω σε αυτόν το διαφορετικό κλάδο της έρευνας, θα ήταν ένα ιδανικό σενάριο για το μέλλον της ερευνητικής πορείας που θα ήθελα να με καθορίσει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(IDF), T.I.D.F. (2016) ‘Evaluation of the Nitrogen conversion factors for dairy and soy’. Available at: <https://shop.fil-idf.org/products/bulletin-idf-n-482-2016-evaluation-nitrogen-conversion-factors-dairy-soy> (Accessed: 21 September 2023).

‘A global brief on hypertension | A global brief on Hyper tension’ (2013). Available at: www.who.int (Accessed: 12 September 2023).

Aabøe, R., Devold, T.G., Eriksen, E.K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K.H., Rukke, E.O. and Vegarud, G.E. (2010) ‘Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes’, *Dairy Sci. Technol.*, 90, pp. 549–563. Available at: <https://doi.org/10.1051/dst/2010018>.

Abad, I., Vignard, J., Bouchenot, C., Graikini, D., Grasa, L., Pérez, M.D., Mirey, G. and Sánchez, L. (2023) ‘Dairy By-Products and Lactoferrin Exert Antioxidant and Antigenotoxic Activity on Intestinal and Hepatic Cells’, *Foods*, 12(10), p. 2073. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12102073>.

Abedin, M.M., Chourasia, R., Chiring Phukon, L., Singh, S.P. and Kumar Rai, A. (2022) ‘Characterization of ACE inhibitory and antioxidant peptides in yak and cow milk hard chhurpi cheese of the Sikkim Himalayan region’, *Food Chemistry: X*, 13(October 2021), p. 100231. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100231>.

Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Peres, C., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F. and Hernández-Mendoza, A. (2017) ‘Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains’, *Journal of Dairy Science*, 100(1), pp. 65–75. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>.

Ahmed, A.S., El-Bassiony, T., Elmalt, L.M. and Ibrahim, H.R. (2015) ‘Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins’, *Food Research International*, 74, pp. 80–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) ‘Pathogen recognition and innate immunity’, *Cell*, 124(4), pp. 783–801. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

Aktan, F. (2004) ‘iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation’, *Life Sciences*, 75(6), pp. 639–653. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>.

Alamdari, E.K. and Ehsani, M.R. (2017) ‘Antimicrobial Peptides Derived from Milk: A Review’, *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), pp. 49–56.

Ali, M.A., Kamal, M.M., Rahman, M.H., Siddiqui, M.N., Haque, M.A., Saha, K.K. and Rahman, M.A. (2022) ‘Functional dairy products as a source of bioactive peptides and

probiotics: current trends and future prospectives’, *Journal of Food Science and Technology*, 59(4), pp. 1263–1279. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05091-8>.

Allen, D.D., Caviedes, R., Cárdenas, A.M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J. and Caviedes, P.A. (2005) ‘Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies’, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8), pp. 757–768. Available at: <https://doi.org/10.1080/03639040500216246>.

Altuntas, S. and Hapoglu, H. (2019) ‘Kefir-type drinks from whey’, *Non-alcoholic Beverages: Volume 6. The Science of Beverages*, pp. 185–226. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00007-4>.

Alvarado, Y., Muro, C., Illescas, J., Díaz, M. del C. and Riera, F. (2019) ‘Encapsulation of antihypertensive peptides from whey proteins and their releasing in gastrointestinal conditions’, *Biomolecules*, 9(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/biom9050164>.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. and Çapanoğlu, E. (2016) ‘Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), pp. 997–1027. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.

Araújo, D.F.S., Guerra, G.C.B., Pintado, M.M.E., Sousa, Y.R.F., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Araújo, R.F., Gálvez, J., Queiroga, R.D.C.R.E. and Rodriguez-Cabezas, M.E. (2017) ‘Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice’, *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185382>.

Arbizu, S., Chew, B., Mertens-Talcott, S.U. and Noratto, G. (2020) ‘Commercial whey products promote intestinal barrier function with glycomacropptide enhanced activity in downregulating bacterial endotoxin lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation: In vitro’, *Food and Function*, 11(7), pp. 5842–5852. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0fo00487a>.

Arshad, U. e. T., Hassan, A., Ahmad, T., Naeem, M., Chaudhary, M.T., Abbas, S.Q., Randhawa, M.A., Pimentel, T.C., da Cruz, A.G. and Aadil, R.M. (2023) ‘A recent glance on the valorisation of cheese whey for industrial prerogative: high-value-added products development and integrated reutilising strategies’, *International Journal of Food Science and Technology*, 58(4), pp. 2001–2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16168>.

Ashokbhai, J.K., Basaiawmoit, B., Das, S., Sakure, A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Padhi, S., Rai, A.K., Liu, Z. and Hatia, S. (2022) ‘Antioxidative, antimicrobial and anti-inflammatory activities and release of ultra-filtered antioxidative and antimicrobial peptides during fermentation of sheep milk: In-vitro, in-silico and molecular interaction studies’, *Food Bioscience*, 47(January), p. 101666. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101666>.

Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G. and Papademas, P. (2018) ‘Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion’,

Food Chemistry, 268(October 2017), pp. 476–484. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.119>.

Athanasakis, K., Souliotis, K., Tountas, Y., Yfantopoulos, J., Kyriopoulos, J. and Hatzakis, A. (2014) ‘A short-term cost-effectiveness analysis of hypertension treatment in Greece’, *Hellenic Journal of Cardiology*, 55(3), pp. 197–203.

Auestad, N. and Layman, D.K. (no date) ‘Dairy bioactive proteins and peptides: a narrative review’. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab097>.

Auldist, M.J., Walsh, B.J. and Thomson, N.A. (1998) ‘Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand’, *Journal of Dairy Research*, 65(3), pp. 401–411. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029998002970>.

Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. (2014) ‘Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal’. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.

Ayyash, M., Al-Dhaheri, A.S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J. and Abushelaibi, A. (2018) ‘In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk’, *Journal of Dairy Science*, 101(2), pp. 900–911. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13400>.

Baba, W.N., Baby, B., Mudgil, P., Gan, C.Y., Vijayan, R. and Maqsood, S. (2021) ‘Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides’, *Lwt*, 143(November 2020), p. 111135. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111135>.

Baek, Y.S., Haas, S., Hackstein, H., Bein, G., Hernandez-Santana, M., Lehrach, H., Sauer, S. and Seitz, H. (2009) ‘Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells’, *BMC Immunology*, 10, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-18>.

Ballatore, M.B., Bettiol, M. del R., Vanden Braber, N.L., Aminahuel, C.A., Rossi, Y.E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L.R. and Montenegro, M.A. (2020) ‘Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin’, *Food Chemistry*, 319(February), p. 126472. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472>.

Bamdad, F., Shin, S.H., Suh, J.W., Nimalaratne, C. and Sunwoo, H. (2017) ‘Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes’, *Molecules*, 22(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22040609>.

Baptista, D.P. and Gigante, M.L. (2021) ‘Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), pp. 4010–4017. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>.

Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Kostic, A.,

Ignjatovic, I.S. and Milincic, D. (2019a) 'The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses', *Foods*, 8(3), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods8030094>.

Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Kostic, A., Ignjatovic, I.S. and Milincic, D. (2019b) 'The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses', *Foods*, 8(3), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods8030094>.

Barnholt, K.E., Kota, R.S., Aung, H.H. and Rutledge, J.C. (2009) 'Adenosine Blocks IFN- γ -Induced Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 to Reduce Macrophage Activation', *The Journal of Immunology*, 183(10), pp. 6767–6777. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900331>.

Battin, E.E. and Brumaghim, J.L. (2009) 'Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms', *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996) 'The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay', *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp. 70–76. Available at: <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>.

Bernabucci, U., Basiricò, L. and Morera, P. (2013) 'Impact of hot environment on colostrum and milk composition.', *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 59(1), pp. 67–83. Available at: <https://doi.org/10.1170/T914>.

Bernabucci, U., Catalani, E., Basiricò, L., Morera, P. and Nardone, A. (2014) 'In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses', *International Dairy Journal*, 37(1), pp. 16–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.02.009>.

Bernstein, K.E., Shen, X.Z., Gonzalez-Villalobos, R.A., Billet, S., Okwan-Duodu, D., Ong, F.S. and Fuchs, S. (2011) 'Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE)', *Current Opinion in Pharmacology*, 11(2), pp. 105–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.11.001>.

Bleoussi, R.T.M., Konfo, C.T.R., Tchekessi, C.C.K., Sachi, P.A., Banon, J.S.B., Djogbe, A.A., Assogba, K.T., Edwige, D.-A. and Innocent, B.Y. (2020) 'Nutritional quality and use of whey in human food for its valorization', *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2020(01), pp. 2581–9615. Available at: <https://doi.org/10.30574/wjarr>.

Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L. and Beaufrère, B. (1997) 'Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp. 14930–14935. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>.

Bolling, B.W., Chen, Y.Y., Kamil, A.G. and Chen, C.Y.O. (2012) 'Assay Dilution Factors Confound Measures of Total Antioxidant Capacity in Polyphenol-Rich Juices',

Journal of Food Science, 77(2). Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02538.x>.

Boutrou, R., Henry, G. and Sanchez-Rivera, L. (2015) 'On the trail of milk bioactive peptides in human and animal intestinal tracts during digestion: A review', *Dairy Science and Technology*, 95(6), pp. 815–829. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0210-0>.

Bouzerzour, K., Morgan, F., Cuinet, I., Bonhomme, C., Jardin, J., Le Huërrou-Luron, I. and Dupont, D. (2012) 'In vivo digestion of infant formula in piglets: Protein digestion kinetics and release of bioactive peptides', *British Journal of Nutrition*, 108(12), pp. 2105–2114. Available at: <https://doi.org/10.1017/S000711451200027X>.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. and Recio, I. (2019) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature protocols*, 14(4), pp. 991–1014. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41596-018-0119-1>.

Brodziak, A., Litwińczuk, Z., Barłowska, J. and Król, J. (2012) 'Effect of Breed and Feeding System on Content of Selected Whey Proteins in Cow's Milk in Spring-Summer and Autumn-Winter Seasons', *Annals of Animal Science*, 12(2), pp. 261–269. Available at: <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0022-6>.

Bučević-Popović, V., Delaš, I., Medugorac, S., Pavela-Vrančić, M. and Kulišić-Bilušić, T. (2014) 'Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk', *International Journal of Dairy Technology*, 67(3), pp. 394–401. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12126>.

Buchanan, D., Martindale, W., Romeih, E. and Hebishy, E. (2023) 'Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives', *International Journal of Dairy Technology*, 76(2), pp. 291–312. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12935>.

Bustamante, S.Z., González, J.G., Sforza, S. and Tedeschi, T. (2021) 'Bioactivity and peptide profile of whey protein hydrolysates obtained from Colombian double-cream cheese production and their products after gastrointestinal digestion', *Lwt*, 145(November 2020). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111334>.

Caccavo, D., Pellegrino, N.M., Altamura, M., Rigon, A., Amati, L., Amoroso, A. and Jirillo, E. (2002) 'Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application', *Journal of Endotoxin Research*, 8(6), pp. 403–417. Available at: <https://doi.org/10.1179/096805102125001000>.

Cai, J., Li, X., Du, H., Jiang, C., Xu, S. and Cao, Y. (2020) 'Immunomodulatory significance of natural peptides in mammals: Promising agents for medical application', *Immunobiology*, 225(3), p. 151936. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151936>.

Cai, J., Li, X., Wang, X., Jiang, C., Shen, D., Cui, X., Xie, K., Ji, C. and Cao, Y. (2021) 'A human β -casein-derived peptide BCCY-1 modulates the innate immune response', *Food Chemistry*, 348(January). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129111>.

Caira, S., Pinto, G., Vitaglione, P., Dal Piaz, F., Ferranti, P. and Addeo, F. (2016) 'Identification of casein peptides in plasma of subjects after a cheese-enriched diet', *Food Research International*, 84, pp. 108–112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.023>.

Canabady-Rochelle, L.L.S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F. and Girardet, J.M. (2015) 'Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods', *Food Chemistry*, 183, pp. 129–135. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.147>.

Cao, G., Alessio, H.M. and Cutler, R.G. (1993) 'Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants', *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), pp. 303–311. Available at: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R).

Cao, Y., Xie, L., Liu, K., Liang, Y., Dai, X., Wang, X., Lu, J., Zhang, X. and Li, X. (2021) 'The antihypertensive potential of flavonoids from Chinese Herbal Medicine: A review', *Pharmacological Research*, 174, pp. 1043–6618. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105919>.

Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P.N. and Bowie, A.G. (2006) 'The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling', *Nature Immunology*, 7(10), pp. 1074–1081. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1382>.

Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P. and Fiat, A.M. (1998) 'Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt', *Biochimie*, 80(2), pp. 155–165. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80022-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80022-9).

Chandrapala, J., Duke, M.C., Gray, S.R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M. and Vasiljevic, T. (2015) 'Properties of acid whey as a function of pH and temperature', *Journal of Dairy Science*, 98(7), pp. 4352–4363. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9435>.

Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R.A.M.M., Savelkoul, F.J., Wichers, H.J., Savelkoul, H.F.J. and 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. Available at: <https://doi.org/10.1039/c0fo00113a>.

Chanput, W., Mes, J.J. and Wichers, H.J. (2014a) 'International Immunopharmacology THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach', *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2014.08.002>.

Chanput, W., Mes, J.J. and Wichers, H.J. (2014b) 'THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach', *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>.

Checa, J. and Aran, J.M. (2020) 'Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes', *Journal of Inflammation Research*, 13, pp. 1057–1073. Available at: <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>.

Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1991) 'Introduction to free radicals', *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 22(100), pp. 1–18. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)70041-X](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70041-X).

Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C. (2004) 'Diversity of structures and properties among catalases', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), pp. 192–208. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>.

Chen, B., Lewis, M.J. and Grandison, A.S. (2014) 'Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK', *Food Chemistry*, 158, pp. 216–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.118>.

Chen, C., Wang, L., Chen, Z., Luo, X., Li, Yongfu, Wang, R., Li, J., Li, Yanan, Wang, T. and Wu, J. (2019) 'Effects of Milk Proteins on the Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Oat Phenolics During In Vitro Digestion', *Journal of Food Science*, 84(4), pp. 895–903. Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14499>.

Chen, J., Lindmark-Månsson, H. and Åkesson, B. (2000) 'Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey', *International Dairy Journal*, 10(5–6), pp. 347–351. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00057-1).

Cho, S.J. (2020) 'Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion', *Lwt*, 126(February), p. 109206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109206>.

Chun, S.H., Kim, H.H., Kim, Y. and Lee, K.W. (2020) 'Characterization of macrophage stimulating compound in glycated whey protein concentrate', *Food Science and Biotechnology*, 29(8), pp. 1113–1123. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00746-2>.

Chun, S.H., Lee, H.A., Lee, K.B., Kim, S.H., Park, K.Y. and Lee, K.W. (2016) 'Effects of glycated whey protein concentrate on pro-inflammatory cytokine expression and phagocytic activity in RAW264.7 macrophages', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(2), pp. 199–206. Available at: <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00596>.

Ciesielska, A., Matyjek, M. and Kwiatkowska, K. (2021) 'TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(4), pp. 1233–1261. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>.

Cloetens, L., Panee, J. and Åkesson, B. (2013) 'The antioxidant capacity of milk - The application of different methods in vitro and in vivo', *Cellular and Molecular Biology*,

59(1), pp. 43–57. Available at: <https://doi.org/10.1170/T946>.

Conte, F.L., Pereira, A.C., Brites, G., Ferreira, I., Silva, A.C., Sebastião, A.I., Matos, P., Pereira, C., Batista, M.T., Sforcin, J.M. and Cruz, M.T. (2022) ‘Exploring the antioxidant, anti-inflammatory and antiallergic potential of Brazilian propolis in monocytes’, *Phytomedicine Plus*, 2(2). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100231>.

Conway, V., Gauthier, S.F. and Pouliot, Y. (2013) ‘Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), pp. 364–372. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf304309g>.

Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J. and Brandelli, A. (2014) ‘Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities’, *Peptides*, 61, pp. 48–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>.

Corrochano, A.R., Arranz, E., De Noni, I., Stuknytė, M., Ferraretto, A., Kelly, P.M., Buckin, V. and Giblin, L. (2018a) ‘Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion’, *Journal of Functional Foods*, 49(August), pp. 526–535. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.043>.

Corrochano, A.R., Arranz, E., De Noni, I., Stuknytė, M., Ferraretto, A., Kelly, P.M., Buckin, V. and Giblin, L. (2018b) ‘Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion’, *Journal of Functional Foods*, 49(May), pp. 526–535. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.043>.

Corrochano, A.R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P.M., Buckin, V. and Giblin, L. (2019) ‘Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion’, *Journal of Dairy Science*, 102(1), pp. 54–67. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14581>.

Cui, Q., Duan, Y., Zhang, M., Liang, S., Sun, Y., Cheng, J. and Guo, M. (2022) ‘Peptide profiles and antioxidant capacity of extensive hydrolysates of milk protein concentrate’, *Journal of Dairy Science*, 105(10), pp. 7972–7985. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21496>.

Dabarera, M., Athiththan, L. and Perera, R. (2015) ‘Antihypertensive peptides from curd’, *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 36(2), p. 214. Available at: <https://doi.org/10.4103/0974-8520.175534>.

Dai, J., Fang, P., Saredy, J., Xi, H., Ramon, C., Yang, W., Choi, E.T., Ji, Y., Mao, W., Yang, X. and Wang, H. (2017) ‘Metabolism-associated danger signal-induced immune response and reverse immune checkpoint-activated CD40⁺ monocyte differentiation’, *Journal of Hematology and Oncology*, 10(1), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0504-1>.

Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B. and Dockrell, D.H. (2010a) ‘The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages’, *PLoS ONE*, 5(1), p. e8668. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.

Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B. and Dockrell, D.H. (2010b) 'The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages', *PLoS ONE*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.

Darnell, J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) 'Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2884122>', *Advancement Of Science*, 264(5164), pp. 1415–1421.

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. and Bartolomé, B. (2004) 'Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), pp. 48–54. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0305231>.

Dave, L.A., Hayes, M., Mora, L., Montoya, C.A., Moughan, P.J. and Rutherford, S.M. (2016) 'Gastrointestinal endogenous protein-derived bioactive peptides: An in vitro study of their gut modulatory potential', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17040482>.

Deeth, H. and Bansal, N. (2018) *Whey proteins, Whey Proteins: From Milk to Medicine*. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00001-1>.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B.E. (2009) 'Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview', *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6), pp. 313–325. Available at: <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.

Devi, S., Kumar, N., Kapila, S., Mada, S.B., Reddi, S., Vij, R. and Kapila, R. (2017) 'Buffalo casein derived peptide can alleviates H₂O₂ induced cellular damage and necrosis in fibroblast cells', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(7), pp. 485–495. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.04.009>.

Dharmisthaben, P., Sakure, A., Liu, Z., Maurya, R., Das, S., Basaiawmoit, B., Kumari, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Gawai, K.M., Baba, W.N., Maqsood, S. and Hati, S. (2023) 'Identification and molecular mechanisms of novel antioxidative peptides from fermented camel milk (Kachchi breed, India) with anti-inflammatory activity in raw macrophages cell lines', *International Journal of Dairy Technology*, 76(1), pp. 111–125. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12911>.

DiBona, G.F. (2004) 'The Sympathetic Nervous System and Hypertension Recent Developments', *Hypertension*, 43(2 I), pp. 147–150. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000113047.47711.fa>.

Dinarello, C.A. (2000) 'Proinflammatory cytokines', *Chest*, 118(2), pp. 503–508. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>.

Dineshbhai, C.K., Basaiawmoit, B., Sakure, A.A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Patil, G.B., Mankad, M., Liu, Z. and Hati, S. (2022) 'Exploring the potential of Lactobacillus and Saccharomyces for biofunctionalities and the release of bioactive peptides from whey protein fermentate', *Food Bioscience*, 48(April), p.

101758. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101758>.

Ding, L., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, L., Liu, B. and Liu, J. (2014) 'Transport of egg white ACE-inhibitory peptide, Gln-Ile-Gly-Leu-Phe, in human intestinal Caco-2 cell monolayers with cytoprotective effect', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), pp. 3177–3182. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf405639w>.

Dugo, L., Belluomo, M.G., Fanali, C., Russo, M., Cacciola, F., MacCarrone, M. and Sardanelli, A.M. (2017) 'Effect of Cocoa Polyphenolic Extract on Macrophage Polarization from Proinflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2 State', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/6293740>.

Dullius, A., Goettert, M.I. and de Souza, C.F.V. (2018) 'Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up', *Journal of Functional Foods*, 42(August 2017), pp. 58–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>.

Ejike, C.E.C.C., Collins, S.A., Balasuriya, N., Swanson, A.K., Mason, B. and Udenigwe, C.C. (2017) 'Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health', *Trends in Food Science and Technology*, 59, pp. 30–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.026>.

Elgar, D.F., Hill, J.P., Holroyd, S.E. and Peddie, G.S. (2020) 'Comparison of analytical methods for measuring protein content of whey protein products and investigation of influences on nitrogen conversion factors', *International Journal of Dairy Technology*, 73(4), pp. 790–794. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12709>.

Elliott, W.J. and Ram, C.V.S. (2011) 'Calcium channel blockers', *Journal of Clinical Hypertension*, 13(9), pp. 687–689. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x>.

de Espindola, J.S., Ferreira Taccóla, M., da Silva, V.S.N., dos Santos, L.D., Rossini, B.C., Mendonça, B.C., Pacheco, M.T.B. and Galland, F. (2023) 'Digestion-resistant whey peptides promote antioxidant effect on Caco-2 cells', *Food Research International*, 173(April). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113291>.

Faraci, F.M. and Didion, S.P. (2004) 'Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), pp. 1367–1373. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf>.

Fekete, Á.A., Ian Givens, D. and Lovegrove, J.A. (2015) 'Casein-derived lactotripeptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials', *Nutrients*, 7(1), pp. 659–681. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu7010659>.

Feng, J., Wu, Y., Zhang, L., Li, Y., Liu, S., Wang, H. and Li, C. (2019) 'Enhanced Chemical Stability, Intestinal Absorption, and Intracellular Antioxidant Activity of Cyanidin-3-O-glucoside by Composite Nanogel Encapsulation', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(37), pp. 10432–10447. Available at:

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04778>.

Ferrario, C.M. and Salem, W. (2006) 'CO RE P O IG DU H CT T JR IO AA RE P', (March), pp. 3–14.

Ferreira, S.S., Martins-Gomes, C., Nunes, F.M. and Silva, A.M. (2022) 'Elderberry (*Sambucus nigra* L.) extracts promote anti-inflammatory and cellular antioxidant activity', *Food Chemistry: X*, 15(August). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100437>.

Fitzgerald, R.J. and Murray, B.A. (2006) 'CONFERENCE CONTRIBUTION Bioactive peptides and lactic fermentations', *International Journal of Dairy Technology*, 59(2). Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x>.

FitzGerald, R.J., Murray, B.A. and Walsh, D.J. (2004) 'Hypotensive Peptides from Milk Proteins', *The Journal of Nutrition*, 134(4), pp. 980S–988S. Available at: <https://doi.org/10.1093/JN/134.4.980S>.

Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., Van Platerink, C., Koning, T.M.M.G. and Kloek, J. (2007) 'Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage Are Absorbed Intact into the Circulation', *The Journal of Nutrition*, 137(4), pp. 953–958. Available at: <https://doi.org/10.1093/JN/137.4.953>.

Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Hernández-Carlos, B. (2019) 'Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism', *Antioxidants*, pp. 1–28. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>.

Fridovich, I. (1995) 'Superoxide radical and superoxide dismutases.', *Annual review of biochemistry*, 64(23), pp. 97–112. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.

Furger, C. (2021) 'Live cell assays for the assessment of antioxidant activities of plant extracts', *Antioxidants*, 10(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10060944>.

Gad, A.S. and Sayd, A.F. (2015) 'Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in Dairy Products—A Review', *Food and Nutrition Sciences*, 06(01), pp. 179–193. Available at: <https://doi.org/10.4236/fns.2015.61019>.

Gao, Y., Zhang, X., Ren, G., Wu, C., Qin, P. and Yao, Y. (2020) 'Peptides from Extruded Lupin (*Lupinus albus* L.) Regulate Inflammatory Activity via the p38 MAPK Signal Transduction Pathway in RAW 264.7 Cells', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), pp. 11702–11709. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02476>.

García-Casas, V.E., Seiquer, I., Pardo, Z., Haro, A., Recio, I. and Olías, R. (2022) 'Antioxidant Potential of the Sweet Whey-Based Beverage Colada after the Digestive Process and Relationships with the Lipid and Protein Fractions', *Antioxidants*, 11(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11091827>.

Gauthier, A.E., Rotjan, R.D. and Kagan, J.C. (2022) 'Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature', *Open*

Biology, 12(10). Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.220146>.

Gauthier, S.F., Pouliot, Y. and Saint-Sauveur, D. (2006) ‘Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins’, *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1315–1323. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>.

Geiselhart, S., Podzhilkova, A. and Hoffmann-Sommergruber, K. (2021) ‘Cow’s milk processing—friend or foe in food allergy?’, *Foods*, 10(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods10030572>.

Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. and Michiels, C. (2015) ‘M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide’, *BMC Cancer*, 15(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>.

Gensel, J.C., Kopper, T.J., Zhang, B., Orr, M.B. and Bailey, W.M. (2017) ‘Predictive screening of M1 and M2 macrophages reveals the immunomodulatory effectiveness of post spinal cord injury azithromycin treatment’, *Scientific Reports*, 7(July 2016), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40144>.

Gharavi, A.T., Hanjani, N.A., Movahed, E. and Doroudian, M. (2022) ‘The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation’, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 27(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00384-y>.

Giromini, C., Cheli, F., Rebucci, R. and 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. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15163>.

Glazunova, O.A., Moiseenko, K. V., Savinova, O.S. and Fedorova, T. V. (2022) ‘In Vitro and In Vivo Antihypertensive Effect of Milk Fermented with Different Strains of Common Starter Lactic Acid Bacteria’, *Nutrients*, 14(24). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu14245357>.

Gómez-Ruiz, J.Á., Ramos, M. and Recio, I. (2002) ‘Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures’, *International Dairy Journal*, 12(8), pp. 697–706. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00059-6).

Gong, H., Gao, J., Wang, Y., Luo, Q.W., Guo, K.R., Ren, F.Z. and Mao, X.Y. (2020) ‘Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells’, *Journal of Dairy Science*, 103(6), pp. 4907–4918. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17513>.

Gordon, S. (2003) ‘Alternative activation of macrophages’, *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp. 23–35. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri978>.

Gorelik, A.S., Yarmukhamedova, E.I., Sharipova, A.F., Gazeev, I.R. and Kanareikina, S.G. (2021) ‘Comparative evaluation of composition and properties of milk from cows of different breeds in cheese production’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 677(2). Available at: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/2/022109>.

Grancieri, M., Martino, H.S.D. and 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 and Food Research*, 63(19), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900021>.

Grażyna, C., Hanna, C., Adam, A. and Magdalena, B.M. (2017) 'Natural antioxidants in milk and dairy products', *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), pp. 165–178. Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12359>.

Guha, S., Sharma, H., Deshwal, G.K. and Rao, P.S. (2021) 'A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species', *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>.

Gupta, C. and Prakash, D. (2017) 'Therapeutic Potential of Milk Whey', *Beverages*, 3(4), p. 31. Available at: <https://doi.org/10.3390/beverages3030031>.

Ha, M., Sabherwal, M., Duncan, E., Stevens, S., Stockwell, P., McConnell, M., El-Din Bekhit, A. and Carne, A. (2015) 'In-depth characterization of sheep (*Ovis aries*) milk whey proteome and comparison with cow (*Bos taurus*)', *PLoS ONE*, 10(10). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139774>.

Haida, Z. and Hakiman, M. (2019) 'A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities', *Food Science and Nutrition*, 7(5), pp. 1555–1563. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>.

Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1991) 'DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems.', *FEBS letters*, 281(1–2), pp. 9–19. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80347-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6).

Hamme, V., Sannier, F., Piot, J.M., Didelot, S. and Bordenave-Juchereau, S. (2009) 'Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: Contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity', *Journal of Dairy Research*, 76(2), pp. 152–157. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029908003877>.

Haque, E., Chand, R. and Kapila, S. (2009) 'Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin', *Food Reviews International*, 25(1), pp. 28–43. Available at: <https://doi.org/10.1080/87559120802458198>.

Hartley, J.W., Evans, L.H., Green, K.Y., Naghashfar, Z., Macias, A.R., Zerfas, P.M. and Ward, J.M. (2008) 'Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line', *Retrovirology*, 5, pp. 6–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-1>.

Håversen, L., Ohlsson, B.G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L.Å. and Mattsby-Baltzer, I. (2002) 'Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B', *Cellular Immunology*, 220(2), pp. 83–95. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(03\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(03)00006-6).

Hejtmánková, A., Pivec, V., Trnková, E. and Dragounová, H. (2012) 'Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period', *Czech Journal of Animal Science*, 57(7), pp. 323–331. Available at: <https://doi.org/10.17221/6007-cjas>.

Henda, Y. Ben, Labidi, A., Arnaudin, I., Bridiau, N., Delatouche, R., Maugard, T., Piot, J.M., Sannier, F., Thiéry, V. and Bordenave-Juchereau, S. (2013) 'Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: Comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), pp. 10685–10690. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf403004e>.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. (2004) 'Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas', *International Dairy Journal*, 14(10), pp. 889–898. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.011>.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. and Amigo, L. (2005) 'Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), pp. 588–593. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf048626m>.

Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M. and Recio, I. (2011) 'Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods', *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), pp. 23–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>.

Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. (2005) 'Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), pp. 1041–1048. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2063>.

Hernández-Ledesma, B., Ramos, M. and Gómez-Ruiz, J.Á. (2011) 'Bioactive components of ovine and caprine cheese whey', *Small Ruminant Research*, 101(1–3), pp. 196–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040>.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. and Amigo, L. (2002) 'Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin', *International Dairy Journal*, 12(10), pp. 805–812. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00080-8).

Hopkins, P.A. and Sriskandan, S. (2005) 'Mammalian toll-like receptors: To immunity and beyond', *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), pp. 395–407. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02801.x>.

Hou, W.C., Chen, H.J. and Lin, Y.H. (2003) 'Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), pp. 1706–1709. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0260242>.

- Huang, D., Boxin, O.U. and Prior, R.L. (2005) 'The chemistry behind antioxidant capacity assays', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp. 1841–1856. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I. and Khan, M.I. (2018) 'Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(2), pp. 287–292. Available at: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0031>.
- Hussein, F.A., Chay, S.Y., Ghanisma, S.B.M., Zarei, M., Auwal, S.M., Hamid, A.A., Ibadullah, W.Z.W. and Saari, N. (2020) 'Toxicity study and blood pressure-lowering efficacy of whey protein concentrate hydrolysate in rat models, plus peptide characterization', *Journal of Dairy Science*, 103(3), pp. 2053–2064. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17462>.
- Hutchins, A.P., Diez, D. and Miranda-Saavedra, D. (2013) 'The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges', *Briefings in Functional Genomics*, 12(6), pp. 489–498. Available at: <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt028>.
- Ibrahim, H.R., Ahmed, A.S. and Miyata, T. (2017) 'Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk', *Journal of Advanced Research*, 8(1), pp. 63–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002>.
- Ibrahim, H.R., Isono, H. and Miyata, T. (2018) 'Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins', *Animal Nutrition*, 4(3), pp. 273–280. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.004>.
- Iriti, M. and Faoro, F. (2007) 'Review of innate and specific immunity in plants and animals', *Mycopathologia*, 164(2), pp. 57–64. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9026-7>.
- Ishikawa, F., Matsubara, T., Koyama, T., Iwamoto, H. and Miyaji, K. (2022) 'Whey protein hydrolysate mitigates both inflammation and endotoxin tolerance in THP-1 human monocytic leukemia cells', *Immunity, Inflammation and Disease*, 10(12), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1002/iid3.737>.
- Iskandar, M.M., Daultbaev, N., Kubow, S., Mawji, N. and 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), pp. 58–68. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114512004655>.
- Iskandar, M.M., Lands, L.C., Sabally, K., Azadi, B., Meehan, B., Mawji, N., Skinner, C.D. and Kubow, S. (2015) 'High hydrostatic pressure pretreatment of whey protein isolates improves their digestibility and antioxidant capacity', *Foods*, 4(2), pp. 184–207. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods4020184>.
- Izquierdo-González, J.J., Amil-Ruiz, F., Zazzu, S., Sánchez-Lucas, R., Fuentes-Almagro, C.A. and Rodríguez-Ortega, M.J. (2019) 'Proteomic analysis of goat milk

kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity', *Food Chemistry*, 295(March), pp. 456–465. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.178>.

Janeway, C.A. (1989) 'Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>.

Janeway, C.A. and Medzhitov, R. (2002) 'Innate immune recognition', *Annual Review of Immunology*, 20(2), pp. 197–216. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.

Jeffrey, M.P., Jones Taggart, H., Strap, J.L., Edun, G. and Green-Johnson, J.M. (2020) 'Milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* R0011 induces a regulatory cytokine profile in LPS-challenged U937 and THP-1 macrophages', *Current Research in Food Science*, 3, pp. 51–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.02.002>.

Jenkins, K.A. and Mansell, A. (2010) 'TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling', *Cytokine*, 49(3), pp. 237–244. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.01.009>.

Jin, M.M., Zhang, L., Yu, H.X., Meng, J., Sun, Z. and Lu, R.R. (2013) 'Protective effect of whey protein hydrolysates on H₂O₂-induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway', *Food Chemistry*, 141(2), pp. 847–852. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.076>.

Johansen, A.G., Vegarud, G.E. and Skeie, S. (2002) 'Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses', *International Dairy Journal*, 12(7), pp. 621–629. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00054-7).

Juhas, U., Ryba-Stanisławowska, M., Szargiej, P. and Myśliwska, J. (2015) 'Different pathways of macrophage activation and polarization', *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 69, pp. 496–502. Available at: <https://doi.org/10.5604/17322693.1150133>.

Kanwar, J.R. and Kanwar, R.K. (2009) 'Gut health immunomodulatory and anti-inflammatory functions of gut enzyme digested high protein micro-nutrient dietary supplement-Enprocal', *BMC Immunology*, 10, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-7>.

Kaulmann, A., Legay, S., Schneider, Y.J., Hoffmann, L. and Bohn, T. (2016) 'Inflammation related responses of intestinal cells to plum and cabbage digesta with differential carotenoid and polyphenol profiles following simulated gastrointestinal digestion', *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(5), pp. 992–1005. Available at: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500947>.

Kaur, A., Kehinde, B.A., Sharma, P., Sharma, D. and Kaur, S. (2021) 'Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: A review', *Food Chemistry*, 346(November 2020), p. 128719. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128719>.

Kaushansky, K. (2006) 'Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors', pp. 2034–2045.

Kawai, T. and Akira, S. (2006) 'TLR signaling', *Cell Death and Differentiation*, 13(5), pp. 816–825. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>.

Kawai, T. and Akira, S. (2010) 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors', *Nature Immunology*, 11(5), pp. 373–384. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

Khabipov, A., Käding, A., Liedtke, K.R., Freund, E., Partecke, L.I. and Bekeschus, S. (2019) 'RAW 264.7 Macrophage Polarization by Pancreatic Cancer Cells – A Model for Studying Tumour-promoting Macrophages', *Anticancer Research*, 39(6), pp. 2871–2882. Available at: <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13416>.

Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M. and Jaspal, M.H. (2019) 'Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge', *Lipids in Health and Disease*, 18(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>.

Kiewiet, M.B.G., Dekkers, R., Gros, M., Van Neerven, R.J.J., Groeneveld, A., De Vos, P. and Faas, M.M. (2017) 'Toll-like receptor mediated activation is possibly involved in immunoregulating properties of cow's milk hydrolysates', *PLoS ONE*, 12(6), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178191>.

Kiewiet, M.B.G., Dekkers, R., Ulfman, L.H., Groeneveld, A., De Vos, P. and Faas, M.M. (2018a) '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), pp. 604–613. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7fo01537b>.

Kiewiet, M.B.G., Dekkers, R., Ulfman, L.H., Groeneveld, A., De Vos, P. and Faas, M.M. (2018b) '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), pp. 604–613. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7fo01537b>.

Kiewiet, M.B.G., Faas, M.M. and de Vos, P. (2018) 'Immunomodulatory protein hydrolysates and their application', *Nutrients*, 10(7), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10070904>.

Kim, D.H., Chun, S.H., Oh, N.S., Lee, J.Y. and Lee, K.W. (2019) 'Anti-inflammatory activities of Maillard reaction products from whey protein isolate fermented by *Lactobacillus gasseri* 4M13 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells', *Journal of Dairy Science*, 102(9), pp. 7707–7716. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15774>.

Kleekayai, T., Le Gouic, A. V., Deracinois, B., Cudennec, B. and FitzGerald, R.J. (2020) 'In vitro characterisation of the antioxidative properties of whey protein hydrolysates generated under pH- And non pH-controlled conditions', *Foods*, 9(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods9050582>.

Klei, L.R., Lynch, J.M., Barbano, D.M., Oltenacu, P.A., Lednor, A.J. and Bandler, D.K. (1997) 'Influence of Milking Three Times a Day on Milk Quality', *Journal of Dairy Science*, 80(3), pp. 427–436. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75954-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75954-X).

Kodavali, L. and Townsend, R.R. (2006) 'Alcohol and its relationship to blood pressure', *Current Hypertension Reports*, 8(4), pp. 338–344. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11906-006-0074-z>.

Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M. and Žák, A. (2014) 'Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases', *Folia Biologica (Czech Republic)*, 60(4), pp. 153–167.

Kopf-Bolan, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R. and Egger, L. (2014) 'Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion', *International Dairy Journal*, 35(2), pp. 130–138. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.012>.

Korhonen, H. (2009) 'Milk-derived bioactive peptides: From science to applications', *Journal of Functional Foods*, 1(2), pp. 177–187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>.

Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H.S. (2000) 'Bovine milk antibodies for health', *British Journal of Nutrition*, 84(SUPPL. 1). Available at: <https://doi.org/10.1017/s0007114500002361>.

Kosseva, M.R., Panesar, P.S., Kaur, G. and Kennedy, J.F. (2009) 'Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey', *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5), pp. 437–447. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005>.

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M. and Udalova, I.A. (2011) 'IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T H1-TH17 responses', *Nature Immunology*, 12(3), pp. 231–238. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.1990>.

Królczyk, J.B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E. and Sołowiej, B. (2016) 'Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry - A Review', *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), pp. 157–165. Available at: <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0052>.

Kuczyńska, B., Puppel, K., Gołębiewski, M., Metera, E., Sakowski, T. and Słoniewski, K. (2012) 'Differences in whey protein content between cow's milk collected in late pasture and early indoor feeding season from conventional and organic farms in Poland', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(14), pp. 2899–2904. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5663>.

Lawrence, T. and Natoli, G. (2011) 'Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity', *Nature Reviews Immunology*, 11(11), pp. 750–761. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3088>.

Leclerc, P.L., Gauthier, S.F., Bachelard, H., Santure, M. and Roy, D. (2002)

'Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*', *International Dairy Journal*, 12(12), pp. 995–1004. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00125-5).

Lee, K.Y. (2019) 'M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review', *Medical Biological Science and Engineering*, 2(1), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1>.

León-López, A., Pérez-Marroquín, X.A., Estrada-Fernández, A.G., Campos-Lozada, G., Morales-Peñaloza, A., Campos-Montiel, R.G. and Aguirre-álvarez, G. (2022) 'Milk Whey Hydrolysates as High Value-Added Natural Polymers: Functional Properties and Applications', *Polymers*, 14(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/polym14061258>.

Li, B., Xia, Y. and Hu, B. (2020) 'Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(14), pp. 2751–2769. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03453-7>.

Li, C.W., Li, L.L., Chen, S., Zhang, J.X. and Lu, W.L. (2020) 'Antioxidant Nanotherapies for the Treatment of Inflammatory Diseases', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00200>.

Li, E.W.Y. and Mine, Y. (2004) 'Immunoenhancing Effects of Bovine Glycomacropeptide and Its Derivatives on the Proliferative Response and Phagocytic Activities of Human Macrophagelike Cells, U937', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), pp. 2704–2708. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0355102>.

Li, P., Hao, Z., Wu, J., Ma, C., Xu, Y., Li, J., Lan, R., Zhu, B., Ren, P., Fan, D. and Sun, S. (2021) 'Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages', *Frontiers in Immunology*, 12(June), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.700009>.

Li, R., Zhuang, Y., Lin, L., Li, L., Fan, X. and Sun, L. (2023) 'In vitro simulated gastrointestinal digestion stability and in vivo antihypertensive effect of the peptide KYPHFV and its network pharmacology', *Journal of Functional Foods*, 107(March), p. 105672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105672>.

Liang, N., Beverly, R.L., Scottoline, B.P. and Dallas, D.C. (no date) 'Peptides Derived from In Vitro and In Vivo Digestion of Human Milk Are Immunomodulatory in THP-1 Human Macrophages', *The Journal of Nutrition Nutritional Immunology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/nxab350>.

Liaskou, E., Wilson, D. V. and Oo, Y.H. (2012) 'Innate immune cells in liver inflammation', *Mediators of Inflammation*, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/949157>.

Lin, I.C. and Kuo, C.D. (2010) 'Pro-inflammatory effects of commercial alpha-lactalbumin on RAW 264.7 macrophages is due to endotoxin contamination', *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), pp. 2642–2649. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.034>.

Lin, L., Lv, S. and Li, B. (2012) 'Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory

and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates', *Food Chemistry*, 131(1), pp. 225–230. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.064>.

Lin, Y., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L. and Guinee, T.P. (2017) 'Seasonal variation in the composition and processing characteristics of herd milk with varying proportions of milk from spring-calving and autumn-calving cows', *Journal of Dairy Research*, 84(4), pp. 444–452. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029917000516>.

Liu, M., Zhang, T., Liang, X., Yuan, Q., Zeng, X., Wu, Z., Pan, D., Tao, M. and Guo, Y. (2021) 'Production and transepithelial transportation of casein-derived peptides and identification a novel antioxidant peptide LHSMK', *Lwt*, 151(May), p. 112194. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112194>.

Lohmeier, T.E. (2001) 'Long-Term Blood Pressure Regulation', *Hypertension*, 7061(01), pp. 147–154.

López-Fandiño, R., Otte, J. and van Camp, J. (2006a) 'Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity', *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1277–1293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.004>.

López-Fandiño, R., Otte, J. and van Camp, J. (2006b) 'Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity', *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1277–1293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.004>.

Lourenço da Costa, E., Antonio da Rocha Gontijo, J. and Netto, F.M. (2007) 'Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates', *International Dairy Journal*, 17(6), pp. 632–640. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.003>.

Ma, J.J., Mao, X.Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S.W. and Li, Y.H. (2014) 'Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate', *Lwt*, 56(2), pp. 296–302. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.019>.

Ma, S., Wang, C. and Guo, M. (2018) 'Changes in structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment', *Ultrasonics Sonochemistry*, 43(December 2017), pp. 227–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.01.017>.

Ma, Y., Liu, J., Shi, H. and Yu, L. (Lucy) (2016) 'Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein', *Journal of Dairy Science*, 99(9), pp. 6902–6912. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11186>.

Ma, Y., Xu, J., Guo, R., Teng, G., Chen, Y. and Xu, X. (2023) 'In vitro gastrointestinal model for the elderly: Effect of high hydrostatic pressure on protein structures and antioxidant activities of whey protein isolate', *Food Bioscience*, 52(January), p. 102452. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102452>.

Madika, A.L. and Mounier-Vehier, C. (2017) 'Smoking and blood pressure: A complex relationship', *Presse Medicale*, 46(7-8P1), pp. 697–702. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.07.001>.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E. and Xavier Malcata, F. (2007) 'Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties', *Food Research International*, 40(10), pp. 1197–1211. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>.

Maeß, M.B., Sendelbach, S. and Lorkowski, S. (2010) 'Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages', *BMC Molecular Biology*, 11, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-90>.

Majumder, K., Mine, Y. and Wu, J. (2016) 'The potential of food protein-derived anti-inflammatory peptides against various chronic inflammatory diseases', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), pp. 2303–2311. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7600>.

Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R. and Sarkar, P. (2018) *Bioactive peptides from whey proteins, Whey Proteins: From Milk to Medicine*. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1>.

Mansinhbhai, C.H., Sakure, A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Das, S. and Hati, S. (2022) 'Significance of whey protein hydrolysate on anti-oxidative, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities and release of peptides with biofunctionality: an in vitro and in silico approach', *Journal of Food Science and Technology*, 59(7), pp. 2629–2642. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05282-3>.

Mao, X.Y., Cheng, X., Wang, X. and Wu, S.J. (2011) 'Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis', *Food Chemistry*, 126(2), pp. 484–490. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.025>.

Marcone, S., Belton, O. and Fitzgerald, D.J. (2017) 'Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), pp. 152–162. Available at: <https://doi.org/10.1111/bcp.13002>.

Markell, L.K., Wezalis, S.M., Roper, J.M., Zimmermann, C. and Delaney, B. (2017) 'Incorporation of in vitro digestive enzymes in an intestinal epithelial cell line model for protein hazard identification', *Toxicology in Vitro*, 44(April), pp. 85–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.018>.

Marshall, O.J. (2004) 'PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR', *Bioinformatics*, 20(15), pp. 2471–2472. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>.

Maseli, A., Aeschbacher, S., Schoen, T., Fischer, A., Jung, M., Risch, M., Risch, L. and Conen, D. (2017) 'Healthy lifestyle and blood pressure variability in young adults', *American Journal of Hypertension*, 30(7), pp. 690–699. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx034>.

Masotti, A.I., Buckley, N., Champagne, C.P. and Green-johnson, J. (2011)

'Immunomodulatory bioactivity of soy and milk ferments on monocyte and macrophage models', 44, pp. 2475–2481. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.004>.

Matsushita, A., Son, D.O., Satsu, H., Takano, Y., Kawakami, H., Totsuka, M. and Shimizu, M. (2008) 'Inhibitory effect of lactoperoxidase on the secretion of proinflammatory cytokine interleukin-8 in human intestinal epithelial Caco-2 cells', *International Dairy Journal*, 18(9), pp. 932–938. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.01.007>.

Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A., Motas, C., Elverfors, J., Engberg, I. and Hanson, L.Å. (1996) 'Lactoferrin or a Fragment Thereof Inhibits the Endotoxin-Induced Interleukin-6 Response in Human Monocytic Cells', *Pediatric Research* 1996 40:2, 40(2), pp. 257–262. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-199608000-00011>.

Matzinger, P. (2002) 'The danger model: A renewed sense of self', *Science*, 296(5566), pp. 301–305. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1071059>.

Mazorra-Manzano, M.A., Robles-Porchas, G.R., González-Velázquez, D.A., Torres-Llanez, M.J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C.O., González-Córdova, A.F. and Vallejo-Córdova, B. (2020) 'Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ACE-inhibitory activity', *Fermentation*, 6(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010019>.

Meira, S.M.M., Daroit, D.J., Helfer, V.E., Corrêa, A.P.F., Segalin, J., Carro, S. and Brandelli, A. (2012) 'Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay', *Food Research International*, 48(1), pp. 322–329. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>.

Meisel, H. (1997) 'Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins', *Biopolymers - Peptide Science Section*, 43(2), pp. 119–128. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y).

Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A. and Moraru, C.I. (2019) 'Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate', *Journal of Dairy Science*, 102(5), pp. 3978–3984. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15951>.

Merkel, A., Voropaeva, D. and Ondrušek, M. (2021) 'The impact of integrated nanofiltration and electro-dialytic processes on the chemical composition of sweet and acid whey streams', *Journal of Food Engineering*, 298, p. 110500. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2021.110500>.

Meydani, S.N. and Ha, W.K. (2000) 'Immunologic effects of yogurt', *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(4), pp. 861–872. Available at: <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1406>.

Meyer, A.L., Elmadfa, I., Herbacek, I. and Micksche, M. (2007) 'Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines', *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 20(6), pp. 590–598. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2007.00807.x>.

Millán-Linares, M.D.C., Yust, M.D.M., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán, F. and Pedroche, J. (2014) ‘Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway’, *Food Chemistry*, 151, pp. 141–147. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.053>.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993) ‘A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates’, *Clinical Science*, 84(4), pp. 407–412. Available at: <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.

Mills, C.D. (2015) ‘Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages’, *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. and Brodkorb, A. (2014) ‘A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus’, *Food and Function*, 5(6), pp. 1113–1124. Available at: <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.

Miyauchi, H., Hashimoto, S.I., Nakajima, M., Shinoda, I., Fukuwatari, Y. and Hayasawa, H. (1998) ‘Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: Identification of its active domain’, *Cellular Immunology*, 187(1), pp. 34–37. Available at: <https://doi.org/10.1006/cimm.1997.1246>.

Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S. and Sahu, P.S. (2016) ‘Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review’, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), pp. 577–583. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>.

Mollea, C., Marmo, L. and Bosco, F. (2013) *Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry*, *Food Industry*. Available at: <https://doi.org/10.5772/53159>.

de Morais, F.P.R., Pessato, T.B., Rodrigues, E., Peixoto Mallmann, L., Mariutti, L.R.B. and Netto, F.M. (2020) ‘Whey protein and phenolic compound complexation: Effects on antioxidant capacity before and after in vitro digestion’, *Food Research International*, 133(February), p. 109104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109104>.

Morais, H.A., Silvestre, M.P.C., Silva, M.R., Silva, V.D.M., Batista, M.A., Simões e Silva, A.C. and Silveira, J.N. (2015) ‘Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile’, *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), pp. 201–210. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1005-z>.

Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M. and Le Frileux, Y. (2007) ‘Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk’, *Small Ruminant Research*, 68(1–2), pp. 20–34. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.019>.

Mosser, D.M. (2003) 'The many faces of macrophage activation', *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), pp. 209–212. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.0602325>.

Mros, S., Carne, A., Ha, M., Bekhit, A.E.D., Young, W. and McConnell, M. (2017) 'Comparison of the bioactivity of whole and skimmed digested sheep milk with that of digested goat and cow milk in functional cell culture assays', *Small Ruminant Research*, 149, pp. 202–208. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.018>.

Müller, A.K., Schmözl, L., Wallert, M., Schubert, M., Schlörmann, W., Glei, M. and Lorkowski, S. (2019) 'In vitro digested nut oils attenuate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages', *Nutrients*, 11(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11030503>.

Munteanu, I.G. and Apetrei, C. (2021) 'Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.

Murray, B.A., Walsh, D.J. and FitzGerald, R.J. (2004) 'Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), pp. 127–137. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JBBM.2003.12.009>.

Murtaza, M.A., Irfan, S., Hafiz, I., Ranjha, M.M.A.N., Rahaman, A., Murtaza, M.S., Ibrahim, S.A. and Siddiqui, S.A. (2022) 'Conventional and Novel Technologies in the Production of Dairy Bioactive Peptides', *Frontiers in Nutrition*, 9(May), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.780151>.

Nascimento, C.R., Rodrigues Fernandes, N.A., Gonzalez Maldonado, L.A. and Rossa Junior, C. (2022) 'Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 32(July), p. 101383. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101383>.

Nassar, W., Ibrahim, E., Elbarbary, H., Mohamed, H. and Jenssen, H. (2022) 'Antibacterial and Antioxidant Activity of Sheep Whey Protein Hydrolysates and Their Fractions', *Egyptian Journal of Chemistry*, 0(0), pp. 0–0. Available at: <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.137815.6065>.

Naude, C.E., Schoonees, A., Senekal, M., Young, T., Garner, P. and Volmink, J. (2014) 'Low carbohydrate versus isoenergetic balanced diets for reducing weight and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis', *PLoS ONE*, 9(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100652>.

Nguyen, D.N., Sangild, P.T., Li, Y., Bering, S.B. and Chatterton, D.E.W. (2016) 'Processing of whey modulates proliferative and immune functions in intestinal epithelial cells', *Journal of Dairy Science*, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9965>.

Nguyen, H.T.H., Gathercole, J.L., Day, L. and Dalziel, J.E. (2020) 'Differences in peptide generation following in vitro gastrointestinal digestion of yogurt and milk from

cow, sheep and goat', *Food Chemistry*, 317(February), p. 126419. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126419>.

Nishanthi, M., Vasiljevic, T. and Chandrapala, J. (2017) 'Properties of whey proteins obtained from different whey streams', *International Dairy Journal*, 66, pp. 76–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.009>.

Nongonierma, A.B. and Fitzgerald, R.J. (2013) 'Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates', *Peptides*, 39(1), pp. 157–163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.016>.

Nongonierma, A.B., Le Maux, S., Dubrulle, C., Barre, C. and FitzGerald, R.J. (2015) 'Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties', *Journal of Cereal Science*, 65, pp. 112–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.004>.

Nongonierma, A.B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S. and FitzGerald, R.J. (2018) 'Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates', *Food Chemistry*, 244(July 2017), pp. 340–348. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.033>.

O'Keeffe, M.B. and FitzGerald, R.J. (2014) 'Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells', *International Dairy Journal*, 36(2), pp. 128–135. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.013> (Accessed: 1 September 2022).

Okagu, I.U., Ezeorba, T.P.C., Aham, E.C., Aguchem, R.N. and Nechi, R.N. (2022) 'Recent findings on the cellular and molecular mechanisms of action of novel food-derived antihypertensive peptides', *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4(January), p. 100078. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100078>.

Osorio-González, C.S., Gómez-Falcon, N., Brar, S.K. and Ramírez, A.A. (2022) 'Cheese Whey as a Potential Feedstock for Producing Renewable Biofuels: A Review', *Energies*, 15(18), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3390/en15186828>.

Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H. and El-Shabrawy, S.A. (2007) 'Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis', *International Dairy Journal*, 17(5), pp. 488–503. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.05.011>.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R.L. (2001) 'Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), pp. 4619–4626. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.

Oyama, M., Van Hung, T., Yoda, K., He, F. and Suzuki, T. (2017) 'A novel whey tetrapeptide IPAV reduces interleukin-8 production induced by TNF- α in human intestinal Caco-2 cells', *Journal of Functional Foods*, 35, pp. 376–383. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.001>.

Ozleyen, A., Yilmaz, Y.B. and Tumer, T.B. (2021) 'Dataset on the differentiation of THP-1 monocytes to LPS inducible adherent macrophages and their capacity for

NO/iNOS signaling’, *Data in Brief*, 35, p. 106786. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.106786>.

Pålsson-McDermott, E.M. and O’Neill, L.A.J. (2004) ‘Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4’, *Immunology*, 113(2), pp. 153–162. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x>.

Pan, D., Luo, Y. and Tanokura, M. (2005) ‘Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004’, *Food Chemistry*, 91(1), pp. 123–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.055>.

Panel, E. and Nda, A. (2011) ‘Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to isoleucyl-prolyl-proline (IPP) and valyl-prolyl-proline (VPP) and maintenance of normal blood pressure pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006’, *EFSA Journal*, 9(9). Available at: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2380>.

Papademas, P. and Kotsaki, P. (2019) ‘Technological Utilization of Whey towards Sustainable Exploitation’, *Advances in Dairy Research*, 7(231), p. 231. Available at: <https://doi.org/10.35248/2329-888X.19.7.231>.

Park, E., Seo, B.-Y., Yoon, Y.-C. and Lee, S.-M. (2017) ‘Beneficial Effects of Hydrolysates of Whey Proteins in Spontaneously Hypertensive Rats’, *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(11), pp. 794–800. Available at: <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-11-1>.

Park, E.K., Jung, H.S., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, C. and Kim, K.S. (2007) ‘Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli’, *Inflammation Research*, 56(1), pp. 45–50. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>.

Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M. and Haenlein, G.F.W. (2007) ‘Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk’, *Small Ruminant Research*, 68(1–2), pp. 88–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>.

Park, Y.W. and Nam, M.S. (2015) ‘Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review’, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), pp. 831–840. Available at: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>.

Paul, M., Mehr, A.P. and Kreutz, R. (2006) ‘Physiology of local renin-angiotensin systems’, *Physiological Reviews*, 86(3), pp. 747–803. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2005>.

Paz Ocaranza, M., Riquelme, J.A., García, L., Jalil, J.E., Chiong, M., Santos, R.A.S. and Lavandero, S. (2020) ‘Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease’, *Nature Reviews Cardiology*, 17(2), pp. 116–129. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>.

Peña-Ramos, E.A. and Xiong, Y.L. (2003) ‘Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties’, *Meat Science*, 64(3), pp. 259–263. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00187-0).

Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M.C., Adesso, S., Ostacolo, C., Marzocco, S., Novellino, E. and Campiglia, P. (2016) 'Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of "Stracchino" soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability', *Journal of Functional Foods*, 26, pp. 494–505. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.021>.

Peslerbes, M., Fellenberg, A., Jardin, J., Deglaire, A. and Ibáñez, R.A. (2022) 'Manufacture of Whey Protein Hydrolysates Using Plant Enzymes: Effect of Processing Conditions and Simulated Gastrointestinal Digestion on Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity', *Foods*, 11(16). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods11162429>.

Peters, J. (2012) 'Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland', *Peptides*, 34(2), pp. 427–432. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.023>.

Phelan, M., Khaldi, N., Shields, D.C. and Kerins, D.M. (2014) 'Angiotensin converting enzyme and nitric oxide inhibitory activities of novel milk derived peptides', *International Dairy Journal*, 35(1), pp. 38–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.008>.

Piccolomini, A.F., Iskandar, M.M., Lands, L.C. and 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', *Food and Nutrition Research*, 56, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.17549>.

Pihlanto-Leppälä, A. (2000) 'Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides', *Trends in Food Science and Technology*, 11(9–10), pp. 347–356. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6).

Pihlanto, A. (2006) 'Antioxidative peptides derived from milk proteins', *International Dairy Journal*, 16(11), pp. 1306–1314. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>.

Pihlanto, A. (2011) 'Whey proteins and peptides', *Nutrafoods 2011 10:2*, 10(2), pp. 29–42. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF03223386>.

Pinho, S.C.M., Faria, M.A., Melo, A., Pinto, E., Almeida, A., Alves, R., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M. and Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2021) 'Effect of skimmed milk on intestinal tract: Prevention of increased reactive oxygen species and nitric oxide formation', *International Dairy Journal*, 118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105046>.

Pinto, R. V., Antunes, F., Pires, J., Silva-Herdade, A. and Pinto, M.L. (2020) 'A comparison of different approaches to quantify nitric oxide release from NO-releasing materials in relevant biological media', *Molecules*, 25(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25112580>.

Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P. (2012) 'Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review', *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.

Pisoschi, A.M. and Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp. 55–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

Poirier, L. and Lacourcière, Y. (2012) 'The Evolving Role of β -Adrenergic Receptor Blockers in Managing Hypertension', *Canadian Journal of Cardiology*, 28(3), pp. 334–340. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.04.001>.

Polychronopoulou, E., Braconnier, P. and Burnier, M. (2019) 'New Insights on the Role of Sodium in the Physiological Regulation of Blood Pressure and Development of Hypertension', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(September), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00136>.

Power, O., Jakeman, P. and Fitzgerald, R.J. (2013) 'Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides', *Amino Acids*, 44(3), pp. 797–820. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>.

Prakash, P.K., Eligar, S.M., Prakruthi, M. and Jyothi Lakshmi, A. setty (2022) 'Comparative assessment of antioxidant and immunomodulatory properties of skimmed milk protein hydrolysates and their incorporation in beverage mix', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(14), pp. 6414–6422. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.12007>.

Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R. (2003) 'Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), pp. 3273–3279. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0262256>.

Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. (2005) 'Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), pp. 4290–4302. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.

Purkiewicz, A. and Pietrzak-Fiećko, R. (2021) 'Antioxidant Properties of Fruit and Vegetable Whey Beverages and Fruit and Vegetable Mousses', *Molecules*, 26(11), p. 3126. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26113126>.

Qian, Z.Y., Jollès, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F. and Fiat, A.M. (1995) 'Sheep κ -casein peptides inhibit platelet aggregation', *BBA - General Subjects*, 1244(2–3), pp. 411–417. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00047-F](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00047-F).

Quirós, A., Contreras, M. del M., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I. (2009) 'Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties', *Peptides*, 30(10), pp. 1848–1853. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.031>.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A. and Recio, I. (2007) 'Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*', *International Dairy Journal*, 17(1), pp. 33–41. Available

at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.011>.

Rafiee Tari, N., Arranz, E. and Corredig, M. (2019) 'Effect of protein composition of a model dairy matrix containing various levels of beta-casein on the structure and anti-inflammatory activity of: In vitro digestates', *Food and Function*, 10(4), pp. 1870–1879. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8fo01860j>.

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O. and Khan, M.I. (2016) 'Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(7), pp. 1022–1028. Available at: <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0452>.

Rai, A.K., Sanjukta, S. and Jeyaram, K. (2017) 'Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), pp. 2789–2800. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1068736>.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), pp. 1231–1237. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

Recio, I. and Visser, S. (2000) 'Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: A comparative study', *International Dairy Journal*, 10(9), pp. 597–605. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00089-3).

Regester, G.O. and Smithers, G.W. (1991) 'Seasonal Changes in the β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Glycomacropeptide, and Casein Content of Whey Protein Concentrate', *Journal of Dairy Science*, 74(3), pp. 796–802. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78227-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78227-1).

Regester, G.O., Smithers, G.W., Mangino, M.E. and Pearce, R.J. (1992) 'Seasonal Changes in the Physical and Functional Properties of Whey Protein Concentrates', *Journal of Dairy Science*, 75(11), pp. 2928–2936. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78055-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78055-2).

Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., De Medina, F.S. and Martínez-Augustín, O. (2009) 'Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- κ B signal transduction pathways', *British Journal of Pharmacology*, 157(7), pp. 1232–1240. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00195.x>.

Revilla, I., González-Martín, M.I., Vivar-Quintana, A.M., Blanco-López, M.A., Lobos-Ortega, I.A. and Hernández-Hierro, J.M. (2016) 'Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy', *Journal of Dairy Science*, 99(7), pp. 5074–5082. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10564>.

Reyes-Díaz, A., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R. and Vallejo-Cordoba, B. (2018) 'Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins', *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), pp. 1–9.

Available at: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12421>.

Rhaleb, N.E., Yang, X.P. and Carretero, O.A. (2011) 'The Kallikrein-Kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function', *Comprehensive Physiology*, 1(2), pp. 971–993. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c100053>.

Rizzello, C.G., Losito, I., Gobetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D. and Zambonin, P.G. (2005) 'Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties', *Journal of Dairy Science*, 88(7), pp. 2348–2360. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1).

Robert, B. and Brown, E.B. (2004) *No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析* Title.

Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., Mayta-Apaza, A., Giusti, M., Jiménez-Flores, R. and García-Cano, I. (2021) 'Invited review: Acid whey trends and health benefits', *Journal of Dairy Science*, 104(2), pp. 1262–1275. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>.

Rodríguez-Carrio, J., Fernández, A., Riera, F.A. and Suárez, A. (2014) 'Immunomodulatory activities of whey β -lactoglobulin tryptic-digested fractions', *International Dairy Journal*, 34(1), pp. 65–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.004>.

Rose-john, S., Waetzig, G.H., Scheller, J., Grötzinger, J. and Seeger, D. (2007) 'The IL-6 / sIL-6R complex as a novel', *Expert opinion therapeutics and targets*, 11, pp. 613–624.

Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W. and Zlabinger, G.J. (1992) 'A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate', *Journal of Immunological Methods*, 156(1), pp. 39–45. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90008-H](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90008-H).

Rozenberg, S., Body, J.J., Bruyère, O., Bergmann, P., Brandi, M.L., Cooper, C., Devogelaer, J.P., Gielen, E., Goemaere, S., Kaufman, J.M., Rizzoli, R. and Reginster, J.Y. (2016) 'Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases', *Calcified Tissue International*, 98(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0062-x>.

Rtibi, K., Marzouki, K., Salhi, A. and Sebai, H. (2021) 'Dietary Supplementation of Carob and Whey Modulates Gut Morphology, Hemato-Biochemical Indices, and Antioxidant Biomarkers in Rabbits', *Journal of Medicinal Food*, 24(10), pp. 1124–1133. Available at: <https://doi.org/10.1089/JMF.2020.0185>.

Ruiz, J.Á.G., Ramos, M. and Recio, I. (2004) 'Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion', *International Dairy Journal*, 14(12), pp. 1075–1080. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.04.007>.

Rushworth, S.A., Chen, X.-L., Mackman, N., Ogborne, R.M. and O'Connell, M.A. (2005) 'Lipopolysaccharide-Induced Heme Oxygenase-1 Expression in Human Monocytic Cells Is Mediated via Nrf2 and Protein Kinase C', *The Journal of Immunology*, 175(7), pp. 4408–4415. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4408>.

Rutherford, K.J. and Gill, H.S. (2000) 'Peptides affecting coagulation', *British Journal of Nutrition*, 84(SUPPL. 1), pp. 99–102. Available at: <https://doi.org/10.1017/s0007114500002312>.

Sabbione, A.C., Luna-Vital, D., Scilingo, A., Añón, M.C. and González De Mejía, E. (2018) 'Amaranth peptides decreased the activity and expression of cellular tissue factor on LPS activated THP-1 human monocytes', *Food and Function*, 9(7), pp. 3823–3834. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8fo00323h>.

Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M.A., Gaillard, J.L., Girardet, J.M. and Miclo, L. (2011) 'Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin', *International Dairy Journal*, 21(4), pp. 214–221. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.011>.

Saint-Sauveur, D., Gauthier, S.F., Boutin, Y. and Montoni, A. (2008) 'Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions', *International Dairy Journal*, 18(3), pp. 260–270. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.07.008>.

Sandström, O., Lönnerdal, B., Graverholt, G. and Hernell, O. (2008) 'Effects of α -lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition', *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), pp. 921–928. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.921>.

Sangsawad, P., Katemala, S., Pao, D., Suwanangul, S., Jeencham, R. and Sutheerawattananonda, M. (2022) 'Integrated Evaluation of Dual-Functional DPP-IV and ACE Inhibitory Effects of Peptides Derived from Sericin Hydrolysis and Their Stabilities during In Vitro-Simulated Gastrointestinal and Plasmin Digestions', *Foods*, 11(23). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods11233931>.

Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Mata-Haro, V. and González-Córdova, A.F. (2016) 'Food-derived immunomodulatory peptides', *Journal of the science of food and agriculture*, 96(11), pp. 3631–3641. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7697>.

Santos, D.I., Saraiva, J.M.A., Vicente, A.A. and Moldão-Martins, M. (2019) *Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients, Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>.

Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M.S. and Savai, R. (2018) 'Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation', *Oncotarget*, 9(25), pp. 17937–17950. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>.

Sawada, Y., Sakamoto, Y., Toh, M., Ohara, N., Hatanaka, Y., Naka, A., Kishimoto, Y., Kondo, K. and Iida, K. (2015) 'Milk-derived peptide Val-Pro-Pro (VPP) inhibits obesity-induced adipose inflammation via an angiotensin-converting enzyme (ACE) dependent cascade', *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(12), pp. 2502–2510. Available at: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500324>.

Schmaier, A.H. (2003) 'The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 285(1), pp. 54-1. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2002>.

Schmölz, L., Wallert, M. and Lorkowski, S. (2017) 'Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay', *Journal of Immunological Methods*, 449, pp. 68–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.06.012>.

Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A. and Muscio, A. (2004) 'Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality', *Small Ruminant Research*, 51(3), pp. 251–259. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00196-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00196-2).

Shahidi, F. and Zhong, Y. (no date) 'Bioactive Peptides'. Available at: <https://academic.oup.com/jaoac/article/91/4/914/5656149> (Accessed: 12 September 2023).

Shalaby, S.M., Zakora, M. and Otte, J. (2006) 'Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates', *Journal of Dairy Research*, 73(2), pp. 178–186. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029905001639>.

Sharif, O., Bolshakov, V.N., Raines, S., Newham, P. and Perkins, N.D. (2007) 'Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages', *BMC Immunology*, 8, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>.

Sheikholeslami Vatani, D. and Ahmadi Kani Golzar, F. (2012) 'Changes in antioxidant status and cardiovascular risk factors of overweight young men after six weeks supplementation of whey protein isolate and resistance training', *Appetite*, 59(3), pp. 673–678. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.08.005>.

Shiratori, H., Feinweber, C., Luckhardt, S., Linke, B., Resch, E., Geisslinger, G., Weigert, A. and Parnham, M.J. (2017) 'THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro', *Molecular Immunology*, 88(May), pp. 58–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.027>.

Shoji, H., Oguchi, S., Shinohara, K., Shimizu, T. and Yamashiro, Y. (2007) 'Effects of Iron-Unsaturated Human Lactoferrin on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Intestinal Epithelial Cells', 61(1), pp. 89–92. Available at: <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250198.22735.20>.

Shu, F., Thammasit, P., Pruksaphon, K., Nosanchuk, J.D. and Youngchim, S. (2022) 'Expression of Cytokine Profiles in Human THP-1 Cells during Phase Transition of

Talaromyces marneffei', *Pathogens*, 11(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens11121465>.

Si-Tahar, M., Touqui, L. and Chignard, M. (2009) 'Innate immunity and inflammation - Two facets of the same anti-infectious reaction', *Clinical and Experimental Immunology*, 156(2), pp. 194–198. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03893.x>.

Siddeeg, A., Alkehayez, N.M., Abu-hiamed, H.A., Al-sanea, E.A. and Al-farga, A.M. (2021) 'Saudi Journal of Biological Sciences Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources : An overview', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), pp. 1633–1644. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>.

Sik, B., Buzás, H., Kapcsándi, V., Lakatos, E., Daróczy, F. and Székelyhidi, R. (2023) 'Journal of King Saud University – Science Antioxidant and polyphenol content of different milk and dairy products', *Journal of King Saud University - Science*, 35(7), p. 102839. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102839>.

Silva-Hernandez, E.R., Nakano, T. and Ozimek, L. (2002) 'Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), pp. 2034–2038. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf010732q>.

De Simone, C., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Chianese, L., Addeo, F. and Ferranti, P. (2009) 'Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey', *Journal of Peptide Science*, 15(3), pp. 251–258. Available at: <https://doi.org/10.1002/psc.1093>.

Simos, Y., Metsios, A., Verginadis, I., D'Alessandro, A.G., Loiudice, P., Jirillo, E., Charalampidis, P., Kouimani, V., Boulaka, A., Martemucci, G. and Karkabounas, S. (2011) 'Antioxidant and anti-platelet properties of milk from goat, donkey and cow: An in vitro, ex vivo and in vivo study', *International Dairy Journal*, 21(11), pp. 901–906. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.007>.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. and Jordan, M.S. (2009) 'T cell activation', *Annual Review of Immunology*, 27, pp. 591–619. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>.

Smith, K.J. and Ainslie, P.N. (2017) 'Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise', *Experimental Physiology*, 102(11), pp. 1356–1371. Available at: <https://doi.org/10.1113/EP086249>.

Smithers, G.W. (2008) 'Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”', *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 695–704. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>.

Smithers, G.W. (2015) 'Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow', *International Dairy Journal*, 48, pp. 2–14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>.

Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Mirzaei, M. and Kianirad, M. (2019) 'Novel β -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk

fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking', *International Dairy Journal*, 97, pp. 201–208. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.012>.

Solieri, L., Valentini, M., Cattivelli, A., Sola, L., Helal, A., Martini, S. and Tagliacruzchi, D. (2022) 'Fermentation of whey protein concentrate by *Streptococcus thermophilus* strains releases peptides with biological activities', *Process Biochemistry*, 121(August), pp. 590–600. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.08.003>.

Speranza, L., Franceschelli, S., Pesce, M., Reale, M., Menghini, L., Vinciguerra, I., De Lutiis, M.A., Felaco, M. and Grilli, A. (2010) 'Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside', *Phytotherapy Research*, 24(9), pp. 1398–1404. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.3173>.

Stobiecka, M., Król, J. and Brodziak, A. (2022) 'Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products', *Animals*, 12(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/ani12030245>.

Storz, G. and Imlay, J.A. (no date) 'Oxidative stress Gisela Storz * and James A Imlay ?', *Current Opinion in Microbiology*, pp. 188–194.

Sultan, S., Huma, N., Butt, M.S. and Shahid, M. (2017) 'Antihypertensive and Antioxidative Potential of Water Soluble Peptide Fraction from Different Yoghurts', *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), p. e12979. Available at: <https://doi.org/10.1111/JFPP.12979>.

Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X. and Wang, H. (2020) 'Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response', *Redox Biology*, 37, p. 101759. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759>.

Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S. (2001) 'Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480–481, pp. 243–268. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00183-X).

Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T. and Król, M. (2018) 'Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages', *PLoS ONE*, 13(6), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>.

Taddei, S. and Bortolotto, L. (2016) 'Unraveling the Pivotal Role of Bradykinin in ACE Inhibitor Activity', *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 16(5), pp. 309–321. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40256-016-0173-4>.

Taga, T. (1997) 'Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines', *Annual Review of Immunology*, 15, pp. 797–819. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.797>.

Tagliacruzchi, D., Helal, A., Verzelloni, E. and Conte, A. (2016) 'Bovine milk antioxidant properties: effect of in vitro digestion and identification of antioxidant

compounds', *Dairy Science and Technology*, 96(5), pp. 657–676. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0294-1>.

Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E. and Hassan, D. (2017) 'Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures', *Food Science and Biotechnology*, 26(5), pp. 1325–1332. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0160-9>.

Takashiba, S., Van Dyke, T.E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A.W. and Shapira, L. (1999) 'Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB', *Infection and immunity*, 67(11), pp. 5573–5578. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.5573-5578.1999>.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J. and Lotze, M.T. (2012) 'PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity', *Immunological Reviews*, 249(1), pp. 158–175. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>.

Tang, Q., Feng, Z., Tong, M., Xu, J., Zheng, G., Shen, L., Shang, P., Zhang, Y. and Liu, H. (2017) 'Piceatannol inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in mice by activating Nrf2', *Food and Function*, 8(11), pp. 3926–3937. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7fo00822h>.

Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojo, A.D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N. and Rodríguez-Figueroa, J.C. (2015) 'Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities', *Journal of Dairy Science*, 98(11), pp. 7635–7639. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9388>.

'Tari_phd_2018_Effect of Milk Protein Composition in a Model Infant Formula on In Vivo and In Vitro Gastric Digestion Behaviour and physiological properties.pdf' (no date).

Tavares, T., Contreras, M. del M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I. and Malcata, F.X. (2011) 'Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes', *Peptides*, 32(5), pp. 1013–1019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.02.005>.

Templeton, G.F. and Templeton, G.F. (2011) 'A two-step approach for transforming continuous variables to normal: Implications and recommendations for IS research', *Communications of the Association for Information Systems*, 28(1), pp. 41–58. Available at: <https://doi.org/10.17705/1cais.02804>.

Timón, M.L., Andrés, A.I., Otte, J. and Petró, M.J. (2019) 'Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin', *Food Research International*, 120(October 2018), pp. 643–649. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.019>.

Tomovska, J., Presilski, S., Gjorgievski, N., Tomovska, N., Qureshi, M.S., Bozinovska, N.P. and St Kliment Ohridski, U. (2013) 'To Cite This Article'. Available at:

www.pvj.com.pk (Accessed: 12 September 2023).

Tonolo, F., Sandre, M., Ferro, S., Folda, A., Scalcon, V., Scutari, G., Feller, E., Marin, O., Bindoli, A. and Rigobello, M.P. (2018) 'Milk-derived bioactive peptides protect against oxidative stress in a Caco-2 cell model', *Food and Function*, 9(2), pp. 1245–1253. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7fo01646h>.

Toopcham, T., Mes, J.J., Wichers, H.J. and Yongsawatdigul, J. (2017) 'Immunomodulatory activity of protein hydrolysates derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinase', *Food Chemistry*, 224, pp. 320–328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.041>.

Torres-Fuentes, C., Contreras, M.D.M., Recio, I., Alaiz, M. and Vioque, J. (2015) 'Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates', *Food Chemistry*, 180, pp. 194–202. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>.

Tsai, J.S., Chen, T.J., Pan, B.S., Gong, S. Da and Chung, M.Y. (2008) 'Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk', *Food Chemistry*, 106(2), pp. 552–558. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.039>.

Tsakali, E., Petrotos, K., D'Alessandr, A.G. and Goulas, P. (2010) 'A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products', *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry 2010, FOODSIM 2010*, pp. 195–201.

Tugal, D., Liao, X. and Jain, M.K. (2013) 'Transcriptional control of macrophage polarization', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), pp. 1135–1144. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>.

Turvey, S.E. and Broide, D.H. (2010) 'Innate immunity', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), pp. 24–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>.

Uduwerella, G. (2017) 'A Novel Strategy for Minimizing Acid Whey Generation during Greek Yoghurt Production'.

Valdez Castillo, M., Laxman Pachapur, V., Brar, S.K., Naghdi, M., Arriaga, S. and Ávalos Ramirez, A. (2020) 'Yeast-driven whey biorefining to produce value-added aroma, flavor, and antioxidant compounds: technologies, challenges, and alternatives', *Critical Reviews in Biotechnology*, 0(0), pp. 930–950. Available at: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1792407>.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), pp. 44–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Muller, M. and Decker, T. (2005) 'Phosphorylation of the STAT1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity', *Epitheorese Klinikes*

Farmakologias kai Farmakokinetikes, 23(1), pp. 36–37.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2002) ‘Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides’, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51(1), pp. 75–87. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00006-4).

Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2005) ‘Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), pp. 399–405. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1926>.

Vinderola, C.G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E. and Matar, C. (2005) ‘Immunomodulating capacity of kefir’, *Journal of Dairy Research*, 72(2), pp. 195–202. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029905000828>.

Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E. and Matar, C. (2006) ‘Effects of kefir fractions on innate immunity’, *Immunobiology*, 211(3), pp. 149–156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.08.005>.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. (2007) ‘Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria’, *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), pp. 106–115. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x>.

Vm, M., Nazer, M., Bassett, K., Jm, W., Vm, M., Nazer, M., Bassett, K. and Jm, W. (2014) ‘diuretics for primary hypertension (Review)’. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003824.pub2.www.cochranelibrary.com>.

Wada, Y. and Lönnerdal, B. (2014) ‘Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action’, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), pp. 503–514. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012>.

Wada, Y., Phinney, B.S., Weber, D. and Lönnerdal, B. (2017) ‘In vivo digestomics of milk proteins in human milk and infant formula using a suckling rat pup model’, *Peptides*, 88, pp. 18–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.012>.

Wadhwa, N., Mathew, B.B., Jatawa, S.K. and Tiwari, A. (2012) ‘Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance’, *International Journal of Current Science*, 3(January 2012), pp. 29–38.

Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y. and Schneider, Y.J. (2010) ‘Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation’, *Toxicology in Vitro*, 24(5), pp. 1441–1449. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.002>.

Wang, B., Wang, Y., Zhang, J., Hu, C., Jiang, J., Li, Y. and Peng, Z.Y. (2023) ‘ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis’, *Archives of Toxicology*, 97(6), pp. 1439–1451. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03476-6>.

Wang, H. and Joseph, J.A. (1999) ‘Quantifying cellular oxidative stress by

dichlorofluorescein assay using microplate reader’, *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5–6), pp. 612–616. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0).

Wang, N., Liang, H. and Zen, K. (2014) ‘Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance’, *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>.

Wang, S., Mateos, R., Goya, L., Amigo-Benavent, M., Sarriá, B. and Bravo, L. (2016) ‘A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity’, *Food and Chemical Toxicology*, 88, pp. 65–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.005>.

Werner, G.H., Floc’, F., Migliore-Samour, D. and Jollés, P. (no date) ‘Immunomodulating peptides’.

Wilson, H.M. (2014) ‘SOCS proteins in macrophage polarization and function’, *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00357>.

Wójciak, K.M., Kęska, P., Okoń, A., Solska, E., Libera, J. and Dolatowski, Z.J. (2018) ‘The influence of acid whey on the antioxidant peptides generated to reduce oxidation and improve colour stability in uncured roast beef’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), pp. 3728–3734. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8883>.

Wojtunik-Kulesza, K.A. (2020) ‘Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes’, *Molecules*, 25(22), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225267>.

Worsztynowicz, P., Białas, W. and Grajek, W. (2020) ‘Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacteria’, *Food Chemistry*, 312(December 2019), p. 126035. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126035>.

Wu, G., Hui, X., Stipkovits, L., Rachman, A., Tu, J., Brennan, M.A. and Brennan, C.S. (2021) ‘Whey protein-blackcurrant concentrate particles obtained by spray-drying and freeze-drying for delivering structural and health benefits of cookies’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 68(January), p. 102606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102606>.

Wynn, T.A., Chawla, A. and Pollard, J.W. (2013) ‘Macrophage biology in development, homeostasis and disease’, *Nature*, 496(7446), pp. 445–455. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12034>.

Xie, N., Wang, C., Ao, J. and Li, B. (2013) ‘Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its in vitro gastrointestinal digest’, *Food Research International*, 51(1), pp. 114–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.001>.

Yadav, J.S.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. (2015) ‘Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides’, *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 756–774.

Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.07.002>.

Yadav, J.S.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D. and Surampalli, R.Y. (2015) 'Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides', *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 756–774. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

Yan, D., Kc, R., Chen, D., Xiao, G. and Im, H.J. (2013) 'Bovine lactoferricin-induced anti-inflammation is, in part, via up-regulation of interleukin-11 by secondary activation of STAT3 in human articular cartilage', *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), pp. 31655–31669. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.440420>.

Yang, C.Q., Li, W., Li, S.Q., Li, J., Li, Y.W., Kong, S.X., Liu, R.M., Wang, S.M. and Lv, W.M. (2014) 'MCP-1 stimulates MMP-9 expression via ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(2), pp. 266–276. Available at: <https://doi.org/10.1159/000362997>.

Yang, W., Zhang, X., Sun, M., Jiao, Y., Li, X., Liu, L. and Wang, Z. (2023) 'The Peptide Fractions of Cheddar Cheese Made with *Lactobacillus helveticus* 1.0612 Play Protective Effects in H₂O₂-Induced Oxidative-Damaged Caco-2 Cells Models', *Foods*, 12(14). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12142790>.

Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J. and Karakhanova, S. (2013) 'Reactive oxygen species in the immune system', *International Reviews of Immunology*, 32(3), pp. 249–270. Available at: <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>.

Ye, H., Tao, X., Zhang, W., Chen, Y., Yu, Q. and Xie, J. (2022) 'Food-derived bioactive peptides: production, biological activities, opportunities and challenges', *Journal of Future Foods*, 2(4), pp. 294–306. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JFUTFO.2022.08.002>.

Ye, S., Chen, Q., Li, D., Zhou, H., Chen, Y., Meng, C. and Hong, J. (2022) 'Isolation and identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pony Seed and evaluation of the inhibitory mechanisms', *Journal of Functional Foods*, 95(June), p. 105151. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105151>.

Yen, G.-C. and Chen, H.-Y. (1995) 'Antioxidant activity seaweeds', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), pp. 27–32.

Yi, J., Zhao, J. and Wu, J. (2017) 'Egg ovotransferrin derived IRW exerts protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells', *Journal of Functional Foods*, 39(May), pp. 160–167. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.012>.

Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M. (2007) 'SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation', *Nature Reviews Immunology*, 7(6), pp. 454–465. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2093>.

Zhang, Q.X., Wu, H., Ling, Y.F. and Lu, R.R. (2013) 'Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS', *Journal of Dairy Research*, 80(3), pp. 367–373. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0022029913000320>.

Zhao, D., Jiang, Y., Sun, J., Li, H., Huang, M., Sun, X. and Zhao, M. (no date) 'Elucidation of The Anti-Inflammatory Effect of Vanillin In Lps-Activated THP-1 Cells', *Nutrition* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14693>.

Zhao, D.R., Jiang, Y.S., Sun, J.Y., Li, H.H., Sun, X.T. and Zhao, M.M. (2019) 'Amelioration of 4-methylguaiacol on LPS-induced inflammation in THP-1 cells through NF- κ B/I κ B α /AP-1 and Nrf2/HO-1 signaling pathway', *Journal of Functional Foods*, 55(October 2018), pp. 95–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.047>.

Zhao, Q., Li, K., Jiang, K., Yuan, Z., Xiao, M., Wei, G., Zheng, W., Wang, X. and Huang, A. (2023) 'Proteomic approach-based comparison of metabolic pathways and functional activities of whey proteins derived from Guishan and Saanen goat milk', *Journal of Dairy Science*, 106(4), pp. 2247–2260. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22404>.

Zhao, Q., Zheng, W., Yuan, Z., Wang, X. and Huang, A. (2023) 'Anti-inflammatory effect of two novel peptides derived from Binglangjiang buffalo whey protein in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages', *Food Chemistry*, 429(July), p. 136804. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136804>.

Zheng, C., Chen, J., Chu, F., Zhu, J. and Jin, T. (2020) 'Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(January), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00314>.

Zhu, L., Zhao, Q., Yang, T., Ding, W. and Zhao, Y. (2015) 'Cellular metabolism and macrophage functional polarization', *International Reviews of Immunology*, 34(1), pp. 82–100. Available at: <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.969421>.

Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D. and Chen, R. (2018) 'Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation', *Biomolecules*, 8(3), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom8030080>.

Zulueta, A., Esteve, M.J. and Frígola, A. (2009) 'ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products', *Food Chemistry*, 114(1), pp. 310–316. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.

Zulueta, A., Maurizi, A., Frígola, A., Esteve, M.J., Coli, R. and Burini, G. (2009) 'Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk', *International Dairy Journal*, 19(6–7), pp. 380–385. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.003>.

Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C. and Best, T.M. (2015) 'Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly', *Acta Physiologica*, 214(3), pp. 329–348. Available at: <https://doi.org/10.1111/apha.12515>.