

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΥΝΟΥΧΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ**  
**ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ**  
**ΟΡΝΙΘΙΑ ΩΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ**

***ΚΟΤΟΡΟΥ ΕΙΡΗΝΗ***

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Κουτσούλη Π. Λέκτορας**

**Μπιζέλης Ι. Αν. Καθηγητής**

**Πολίτης Ι. Καθηγητής**

*Αθήνα, Δεκέμβριος 2010*

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΥΝΟΥΧΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ**  
**ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ**  
**ΟΡΝΙΘΙΑ ΩΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ**

***ΚΟΤΟΡΟΥ ΕΙΡΗΝΗ***

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Κουτσούλη Π. Λέκτορας**

**Μπιζέλης Ι. Αν. Καθηγητής**

**Πολίτης Ι. Καθηγητής**

***Αθήνα, Δεκέμβριος 2010***

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Παναγιώτα Κουτσούλη για την πολύτιμη βοήθειά της, το ενδιαφέρον της, και τις παρατηρήσεις της τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στον κ. Ιωσήφ Μπιζέλη για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του και στον κ. Ιωάννη Πολίτη για την αξιολόγηση της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψή μου αν ξεχνούσα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους στο εργαστήριο, Αντώνη Λαμπιδώνη και Γιώργο Θεοδώρου για τη βοήθειά τους σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Γιώργο Λαλιώτη για την άψογη συνεργασία κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της προσπάθειάς μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα προσφιλή μου πρόσωπα: την οικογένειά μου, τον παππού μου, τους φίλους μου Βάσια, Αντρέα, και την κ. Λίλλυ Κουράτου για τη στήριξή τους.

*Ειρήνη Κοτόρου*

*Αθήνα, Δεκέμβριος 2010*

*“Ευγένεια, καλό μεν, αλλά αγαθό των προγόνων,  
Πλούτος δε τίμιο μεν, αλλά απόκτημα τύχης,  
Δόξα, σεμνό μεν, αλλά αβέβαιο,  
Κάλλος δε περιμάχητο, αλλά ολιγόχρονο,  
Υγεία, τίμιο, αλλά ευμετάστατο,  
Ισχύς δε ζηλευτό, αλλά ευάλωτο από την αρρώστια και τα γηρατεία,  
Παιδεία αθάνατο, και θείο όλων όσων υπάρχουν σ' εμάς”*

*Πλούταρχος*

*Στους γονείς μου, Γιώργο-Βίκυ &  
στα αδέρφια μου Γιάννη-Λεωνίδα..*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Διερεύνηση της επίδρασης του ευνουχισμού στην έκφραση γονιδίων λιπογένεσης σε αναπτυσσόμενα ορνίθια ωοπαγωγικού τύπου	Σελίδα
A	Περίληψη	8
B	Abstract	10
Γ	Θεωρητικό Μέρος	12
1.1	Λιπογένεση στα παραγωγικά ζώα-Εισαγωγή	12
1.2.1	Μεταβολισμός των λιπιδίων στο λιπώδη ιστό	14
1.2.2	Ένζυμα που εμπλέκονται στη λιπογένεση	15
1.3	Λιπογένεση στα πτηνά	18
1.3.1	Παράγοντες που επηρεάζουν τη λιπογένεση στα πτηνά	22
1.4	Επιδράσεις του ευνουχισμού	29
1.5	Λιπόλυση	32
Δ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
1.1	Ζωικό Υλικό	33
1.2	Απομόνωση ολικού RNA	33
1.3	Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος RNA	35
1.4	Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής	37
1.5	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	39

<b>1.6</b>	<b>Συστατικά της PCR αντίδρασης</b>	<b>41</b>
<b>1.7</b>	<b>Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)</b>	<b>43</b>
<b>1.8</b>	<b>Στατιστική Επεξεργασία</b>	<b>51</b>
<b>1.9</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>51</b>
<b>1.9.1</b>	<b>Επίδραση του ευνουχισμού στη γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων</b>	<b>51</b>
<b>1.9.2</b>	<b>Επίδραση της ηλικίας σφαγής στη γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων στους δύο ιστούς</b>	<b>54</b>
<b>1.9.3</b>	<b>Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των δύο αφυδρογονασών στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ</b>	<b>62</b>
<b>2</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>63</b>
<b>Ε</b>	<b>Συμπεράσματα</b>	<b>68</b>
<b>ΣΤ</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>69</b>

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΥΝΟΥΧΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ  
ΟΡΝΙΘΙΑ ΩΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ**

**ΚΟΤΟΡΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο  
Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, e-mail:  
panagiota@aua.gr*

**Περίληψη**

Στα πτηνά το κύριο όργανο λιπογένεσης είναι το ήπαρ. Η διαδικασία της λιπογένεσης περιλαμβάνει μία σειρά από αντιδράσεις όπως η γλυκόλυση, ο κύκλος του κιτρικού οξέως και η σύνθεση των λιπαρών οξέων. Δυο σημαντικά ένζυμα που εμπλέκονται στη λιπογένεση των πτηνών είναι η NADP-αφυδρογονάση του μηλικού (NADP-MDH) και η NADP-αφυδρογονάση του ισοκιτρικού (NADP-ICDH) οξέως.

Ο ευνουχισμός, μια επέμβαση που πραγματοποιείται με αφαίρεση των όρχεων, οδηγεί σε δραστική μείωση των ανδρογόνων και θηλυκοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του αρσενικού ορνίθιου και επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την λιπογένεση, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ηπατικών λιπιδίων και της τριακυλογλυκερόλης και μειώνοντας τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης δύο σημαντικών γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία της λιπογένεσης όπως η μηλική αφυδρογονάση και η ισοκιτρική αφυδρογονάση, στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ αρσενικών και ευνουχισμένων ορνιθίων ωοπαραγωγής.

Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα από το λιπώδη ιστό και το ήπαρ από 60 ορνίθια ενός υβριδίου ωοπαραγωγής. Η επέμβαση του ευνουχισμού πραγματοποιήθηκε στα μισά ορνίθια τον πρώτο μήνα της ηλικίας τους. Η εκτροφή διήρκησε 34 εβδομάδες και πραγματοποιήθηκαν τρεις σφαγές στην ηλικία των 26, 30 και 34 εβδομάδων.

Η επέμβαση του ευνουχισμού δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση των δύο αφυδρογονασών στο λιπώδη ιστό ενώ στο ήπαρ



παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην γονιδιακή έκφραση της μηλικής αφυδρογονάσης που είναι οριακά σημαντική ( $P \leq 0,08$ ). Η ηλικία σφαγής βρέθηκε ότι οριακά επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ ωστόσο στο λιπώδη ιστό δεν επηρέασε τη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής και μηλικής αφυδρογονάσης. Στο ήπαρ, στην ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων, διαπιστώθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ( $P < 0,005$ ) από την πρώτη στη δεύτερη ηλικία σφαγής και από τη δεύτερη στη τρίτη. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι στο λιπώδη ιστό υπάρχει σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της ICDH με την MDH αφυδρογονάση.

Λέξεις κλειδιά: Λιπογένεση στα πτηνά, έκφραση γονιδίων, ορνίθια ωοπαραγωγικού τύπου, ευνουχισμός.

# **EFFECTS OF CAPONIZATION IN THE LIPOGENIC GENE EXPRESSION IN EGG-TYPE CHICKENS**

*EIRINI KOTOROU*

*Faculty of Animal Science and Hydrobiology, Department of Animal Breeding and Husbandry, Iera Odos 75, 11855 Athens, email: panagiota@aau.gr*

## ***Abstract***

The main organ of lipogenesis in birds is liver. The process of lipogenesis includes a series of reactions such as glycolysis, the cycle of citric acid and the composition of fatty acid. Two key enzymes which are involved in lipogenesis are NADP-malic dehydrogenase (NADP-MDH) and NADP-dehydrogenase of isocitrate (NADP-ICDH).

Caponization is an operation carried out by removing the testicles, resulting to the reduction of androgen and to the feminization of male chickens. Moreover it significantly affects the lipogenesis by increasing the hepatic lipid and triacylglycerol concentrations and by reducing non-esterified fatty acids.

The purpose of this study is to investigate the expression of two important genes involved in the process of lipogenesis, such as malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase in the adipose tissue and in the liver of male chickens and capons.

To that end, samples were taken from adipose tissue and liver from 60 hybrid hens. Half of the chickens were subjected to the operation of caponization in the first month of age. The experiment lasted 34 weeks during which three massacres were performed at the age of 26, 30 and 34 weeks respectively.

The process of caponization did not cause any significant variation in gene expression of the two dehydrogenases in adipose tissue, however, there is a marginally significant variation in gene expression of malate dehydrogenase in liver ( $P \leq 0,08$ ). The age of slaughter showed a marginally trend in the diversification of gene expression of isocitrate dehydrogenase in liver but it didn't affect the gene expression of isocitrate and malate dehydrogenase in adipose tissue. In liver, in the group of caponized chickens, significant differences were found in gene expression of isocitrate dehydrogenase ( $P < 0,005$ ) from the first to the second age of slaughter and from the second to the third. Finally, it was observed

that in the adipose tissue there was a significant correlation between the expression of ICDH and MDH dehydrogenase.

***Keywords:*** lipogenesis in birds, gene expression, laying hens, caponization

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

## ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο λιπώδης ιστός διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού του ζώου. Συγκεκριμένα, εξασφαλίζει στον οργανισμό την απαιτούμενη ενέργεια με την κινητοποίηση των λιπαρών οξέων από τις λιποαποθήκες του σώματος, μέσω της διαδικασίας της λιπόλυσης, της υδρόλυσης δηλαδή των τριγλυκεριδίων, της κύριας μορφής αποθήκευσης του λίπους. Πρωταρχικός ρόλος του λιπώδους ιστού είναι η αποθήκευση ενέργειας με τη μορφή τριγλυκεριδίων στις περιπτώσεις κατανάλωσης περίσσειας ενέργειας και η κινητοποίησή της με τη μορφή λιπαρών οξέων, στις περιπτώσεις ανεπαρκούς πρόσληψης ενέργειας (Ingle et al., 1972). Στην όρνιθα, ο λιπώδης ιστός παρουσιάζει μικρή ικανότητα σύνθεσης λιπαρών οξέων (Goodridge, 1968b) και κατανέμεται σε διάφορα μέρη του σώματος, όπως υποδόρια και περιμυϊκά. Τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα κατέχει το κοιλιακό λίπος, αφού αποτελεί ποσοτικά το μεγαλύτερο λιπώδη ιστό από το σύνολο των κύριων λιπωδών ιστών του σώματος και επιπλέον συνιστά μέρος του σφαγίου με αρνητική επίπτωση στην ποιότητά του.

Η λιπογένεση είναι μία διαδικασία που οδηγεί στη σύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων σε όλα τα είδη σπονδυλωτών ζώων. Τα κύρια όργανα λιπογένεσης είναι ο εντερικός βλεννογόνος, το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός και στα θηλαστικά ο μαστικός αδένας. Τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου έχουν ως κύρια δράση την αξιοποίηση των λιπαρών οξέων που απορροφώνται από τον ζωικό οργανισμό μέσω της διατροφής. Σε αντιδιαστολή, οι άλλοι τρεις ιστοί είναι υπεύθυνοι για την εκ νέου σύνθεση των λιπαρών οξέων χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ουσία το ακέτυλο-CoA το οποίο παράγεται από τον καταβολισμό των υδατανθράκων (Vernon et al., 2001).

Στο λιπώδη ιστό των θηλαστικών και ιδιαίτερα στα μηρυκαστικά, οι υδατάνθρακες μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων που συντελούνται στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών παράγουν το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ. Το οξικό οξύ είναι η κύρια πρόδρομος ουσία για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων

στο λιπώδη ιστό των μηρυκαστικών και στο μαστικό αδένια κατά τη γαλακτοπαραγωγή (Vernon et al., 2001). Στα πτηνά και στον άνθρωπο το κύριο όργανο λιπογένεσης είναι το ήπαρ ενώ στους χοίρους είναι όπως και στα μηρυκαστικά ο λιπώδης ιστός. Στους επίμυες και τους κόνικλους για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων είναι εξίσου σημαντικά και ο λιπώδης ιστός και το ήπαρ (Chilliard et al., 1993 · Nafikov et al., 2007).

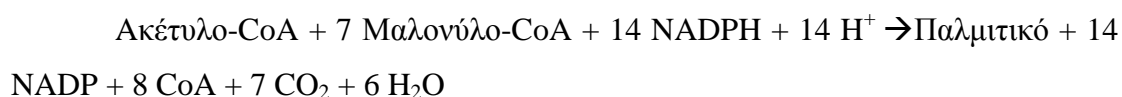
Όπως προαναφέρθηκε ο βασικός ρόλος του λιπώδους ιστού είναι ο έλεγχος της ενεργειακής ισορροπίας, παρέχοντας έτσι στον οργανισμό τα απαραίτητα 'καύσιμα' υπό τη μορφή των λιπαρών οξέων, όταν απαιτείται. Μπορεί, επίσης, να παρέχει μηχανική στήριξη καθώς και θερμική μόνωση (Trayhurn et al., 2005). Επιπλέον οι Cousin et al. (1999) αναφέρουν την ανάμειξη του λιπώδους ιστού σε φλεγμονώδεις διεργασίες καθώς τα προλιποκύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να δράσουν σαν μακροφάγα. Επίσης, ο λιπώδης ιστός παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Η ανακάλυψη της λεπτίνης, (Zhang et al., 1994) μιας κυτοκίνης που εκκρίνεται από τα ώριμα λιποκύτταρα, έδειξε ότι ο λιπώδης ιστός μπορεί να λειτουργήσει ως ένα εκκριτικό και ενδοκρινές όργανο. Πρόσφατα βρέθηκε ότι εκκρίνονται και άλλες ουσίες εκτός της λεπτίνης από το λιπώδη ιστό, παίζοντας σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας καθώς και σε άλλες φυσιολογικές διαδικασίες ( Trayhurn et al., 2001 · Mohamed-Ali et al., 1998 · Ahima et al., 2000). Επομένως, ο ρόλος του λιπώδους ιστού είναι σύνθετος και εκτείνεται από τη ρύθμιση του μεταβολισμού μέχρι την ομοιοστασία του οργανισμού.

Στα πτηνά η αυξημένη εναπόθεση λίπους συσχετίζεται θετικά με την αύξηση του όγκου των λιποκυττάρων και όχι με την αύξηση του αριθμού τους (Cartwright, 1991). Γενικά, η αύξηση του λιπώδους ιστού εξαρτάται τόσο από το μέγεθος των λιποκυττάρων (υπερτροφία) όσο και από τον αριθμό τους (υπερπλασία) (Hood et al., 1979). Επίσης, η υπερβολική ανάπτυξή του επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα των σφάγιων, ενώ είναι επιθυμητή η εναπόθεσή του ενδομυϊκά ( Vernon et al., 2001). Στα μηρυκαστικά, η μεγάλη ανάπτυξη του λιπώδους ιστού κατά την ήβη και κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας έχει επίπτωση στην υγεία τους (κέτωση-τοξιναιμία) καθώς επίσης και στην μελλοντική αναπαραγωγική και γαλακτοπαραγωγική απόδοσή τους ( Rogdakis et al., 1997).

## 1.2.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ

Τα λιπαρά οξέα συντίθενται από ένα εξωμιτοχονδριακό σύστημα (Mayes et al., 2003) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του παλμιτικού οξέος από το ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα. Το παλμιτικό οξύ είναι το τελικό προϊόν της βιοσύνθεσης στους περισσότερους οργανισμούς. Μία σημαντική μεταβολική διαφορά μεταξύ μονογαστρικών ή των πτηνών και των μηρυκαστικών οργανισμών, είναι ότι η πρόδρομος ουσία για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων στα μονογαστρικά και τα πτηνά είναι η γλυκόζη ενώ στα μηρυκαστικά είναι το οξικό οξύ. Αυτό συνήθως οφείλεται στη χαμηλή ενεργότητα της ATP κιτρικής λυάσης και της μηλικής αφυδρογονάσης στο λιπώδη ιστό των μηρυκαστικών παρεμποδίζοντας έτσι τη διοχέτευση της γλυκόζης στο μεταβολισμό του λίπους. Η γλυκόζη στα μηρυκαστικά παράγεται από τη γλυκονεογένεση (Freetly et al., 1996).

Το οξικό οξύ μετασχηματίζεται σε πυροσταφυλικό και στη συνέχεια μέσω οξειδωσης στα μιτοχόνδρια μετασχηματίζεται περαιτέρω σε ακέτυλο-CoA. Το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται από το κύτταρο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η βιοσύνθεση του παλμιτικού τελείται με τη δράση του πολυενζυμικού συμπλέγματος της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase-FAS). Η στοιχειομετρική αντίδραση συνθέσεως είναι η εξής:



Από την παραπάνω αντίδραση φαίνεται ότι για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων απαιτούνται εκτός από άνθρακα, σημαντικά ποσά αναγωγικής δύναμης υπό τη μορφή NADPH για το μετασχηματισμό του ακέτυλο-CoA σε λιπαρά οξέα (Rogdakis et al., 1982 · Guay et al., 2007). Τα σημαντικότερα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή NADPH στα θηλαστικά είναι: 1) η αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης (G6PD) 2) η αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6PGD) 3) η μηλική NADP αφυδρογονάση κυτταροπλασματικής μορφής (ME1 ή MDH1) και 4) η ισοκιτρική NADP αφυδρογονάση κυτταροπλασματικής μορφής (ICDH1).

## 1.2.2 ENZYMA ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ

### ✚ Καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (Acetyl-CoA-Carboxylase-ACC)

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό ξεκινά με την καρβοξυλίωση του δεύτερου ατόμου άνθρακα του οξικού σε μηλονικό. Η παραπάνω αντίδραση καρβοξυλίωσης καταλύεται από το ένζυμο της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA (ACC) (Kim et al., 1997 · Barber et al., 2005 · Barber et al., 1998). Έχουν αναφερθεί δύο ισοένζυμα της ACC τα οποία είναι προϊόντα μεταγραφής 2 διαφορετικών γονιδίων. Συγκεκριμένα το ένα γονίδιο είναι το ACC-α, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης 265 KDa και εντοπίζεται σε λιπογόνους ιστούς, ενώ το άλλο γονίδιο είναι το ACC-β που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 280 KDa, και εντοπίζεται σε μη λιπογόνους ιστούς όπως η καρδιά και ο ρόλος της περιορίζεται στη ρύθμιση της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων (Kim et al., 1994 · Ha et al., 1996).<sup>1</sup>

### ✚ Συνθετάση των λιπαρών οξέων (Fatty acid Synthase-FAS)

Η συνθετάση των λιπαρών οξέων αποτελεί το ένζυμο κλειδί της λιπογένεσης το οποίο καταλύει όλες τις αντιδράσεις οι οποίες εμπλέκονται στο τελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων και ουσιαστικά είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ακέτυλο-CoA και του μηλότυλο-CoA σε παλμιτικό οξύ. Η FAS αποτελεί το πιο σύνθετο πολυλειτουργικό πολυπεπτίδιο που έχει ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα, διότι περιέχει όλα τα καταλυτικά συστατικά που απαιτούνται για την κατάλυση μιας σειράς από 37 διαδοχικές αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του παλμιτικού οξέος (Chirala et al., 1997).

- Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων όπως έχει αναφερθεί απαιτείται ενέργεια η οποία παρέχεται υπό τη μορφή μορίων αναγωγικής ισχύος NADPH. Υπεύθυνα για την παραγωγή μορίων NADPH είναι κυρίως τα εξής κυτταροπλασματικά ένζυμα:

---

<sup>1</sup> Η β-οξειδωση είναι η βιοχημική διαδικασία της αποικοδόμησης των λιπαρών οξέων και επιτελείται στη μήτρα των μιτοχονδρίων των κυττάρων του λιπώδους ιστού και του μυοκαρδίου.

#### ✚ Αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης (G6PD) και Αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6PGD)

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης (G6PD) και η αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6PGD) συγκαταλέγονται στα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στον κύκλο των φωσφοροπεντοζών. Ο κύκλος των φωσφοροπεντοζών χωρίζεται σε δύο στάδια. Το πρώτο, είναι το οξειδωτικό στάδιο του μεταβολισμού της γλυκόζης, κατά το οποίο παράγεται το απαραίτητο NADPH για τη λιπογένεση. Το δεύτερο στάδιο είναι το μη οξειδωτικό, στο οποίο σχηματίζεται η 5-φωσφορική ριβόζη, η οποία χρησιμεύει για τη βιοσύνθεση νουκλεϊνικών οξέων και νουκλεοτιδίων (Tian et al., 1998).

Η G6PD αποτελεί το πρώτο ένζυμο-κλειδί του κύκλου των φωσφοροπεντοζών. Το ένζυμο καταλύει τη μετατροπή της 6-φωσφορογλυκόζης για να παραχθεί το 6-φωσφορογλυκονικό. Παράλληλα από την καταλυτική δράση του ενζύμου παράγεται και ένα μόριο NADPH. Το συγκεκριμένο ένζυμο πέραν της συνεισφοράς του στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, συμβάλλει και στη προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό stress, το οποίο προκαλείται από την παρουσία ελεύθερων ριζών και υπεροξειδίων (Salati & Amir-Ahmady, 2001).

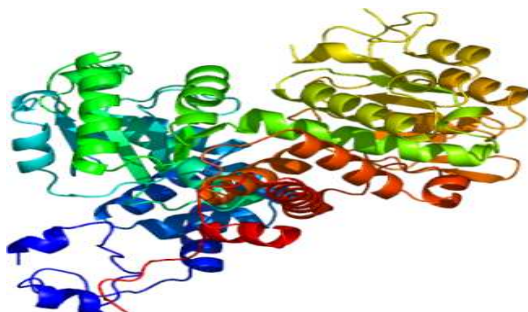
Η 6PGD καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 6-φωσφορογλυκονικού σε 5-φωσφορική ριβουλόζη, με ταυτόχρονη απελευθέρωση CO<sub>2</sub> και αναγωγή του NADP σε NADPH (Novello et al., 1968). Η λειτουργική σημασία του ενζύμου έγκειται στην παροχή NADPH για τη σύνθεση λίπους, και παροχή ριβόζης για την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Wood, 1985).

#### ✚ Κυτταροπλασματική NADP μηλική αφυδρογονάση / Μηλικό ένζυμο (ME)

Το μηλικό ένζυμο καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του μηλικού προς πυροσταφυλικό. Επίσης, συμμετέχει στις αντιδράσεις πυροσταφυλικού/κιτρικού και συμβάλλει στην έξοδο του ακέτυλο-CoA από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Στα πτηνά ο ρόλος του στη λιπογένεση είναι πιο σημαντικός απ'ότι στα μηρυκαστικά εξαιτίας της υψηλής τιμής της ενζυμικής του ενεργότητας. Έτσι το ποσό του NADPH που είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών και δεν παράγεται από τον κύκλο των φωσφοροπεντοζών, παράγεται κυρίως από το μηλικό ένζυμο, μέσω του συστήματος μεταφοράς μηλικού-πυροσταφυλικού. Στα μηρυκαστικά αντίθετα, οι χαμηλές τιμές ενζυμικής ενεργότητας του μηλικού ενζύμου που παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό δεν επιτρέπουν την αποδοχή του παραπάνω προτεινόμενου μοντέλου



(Bergen et al., 2005). Η στερεοχημική δομή της μηλικής αφυδρογονάσης φαίνεται στην εικόνα 1.

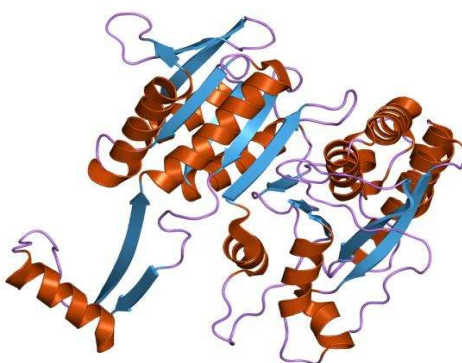


**Εικόνα 1.** Στερεοχημική δομή της μηλικής αφυδρογονάσης.

✚ Κυτταροπλασματική NADP-Ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH)

Η ισοκιτρική αφυδρογονάση επίσης γνωστή ως ICDH, καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού, παράγοντας  $\alpha$ -κετογλουταρικό και  $\text{CO}_2$ . Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και χρησιμοποιεί  $\text{NADP}^+$  ως συμπαράγοντα αντί για  $\text{NAD}^+$ .

Ο ρόλος της στη λιποσύνθεση των πτηνών είναι λιγότερο σημαντικός από αυτόν της μηλικής αφυδρογονάσης. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το  $\text{NADPH}$  το οποίο παράγεται από τη δράση της χρησιμοποιείται στην αναγέννηση της γλουταθειόνης και άλλων συστημάτων τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα των κυττάρων απέναντι σε οξειδωτικούς παράγοντες (Lee et al., 2001 Richards et al., 2003). Η στερεοχημική δομή της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης φαίνεται στην εικόνα 2.



**Εικόνα 2.** Στερεοχημική δομή της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης.

### 1.3 ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΑ ΠΤΗΝΑ

Τα πτηνά έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες περίσσειας ενέργειας, με τη μορφή τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, το λιπώδη ιστό και στη λέκιθο των αναπτυσσόμενων ωοκυττάρων (Hermier, 1997). Η λιπογένεση, δηλ. η μετατροπή της γλυκόζης σε τριγλυκερίδια, λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ των πτηνών (Leveille et al., 1975) και περιλαμβάνει μία σειρά από αντιδράσεις όπως η γλυκόλυση, ο κύκλος του κιτρικού οξέως και η σύνθεση των λιπαρών οξέων οι οποίες καταλύονται από ένζυμα. Η λιπογένεση εξαρτάται από το μεταβολισμό της γλυκόζης διότι έτσι παρέχεται το ακέτυλο -CoA που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων.

Η διαφορετική λιπογενετική ικανότητα του ήπατος έναντι του λιπώδους ιστού, οφείλεται στην έκφραση ενός σημαντικού παράγοντα μεταγραφής, της SREBP-1 (ρυθμιστικό για τη στερόλη τμήμα του υποκινητή όπου προσδέεται η πρωτεΐνη 1). Η SREBP-1 είναι μία πρωτεΐνη που ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου των υποδοχέων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Το γονίδιο για τη SREBP-1 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και πολύ λιγότερο στο λιπώδη ιστό (Gondret et al., 2001). Η έκφραση μιας πληθώρας ενζύμων λιπογένεσης όπως της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS), του μηλικού ενζύμου (ME), της ακέτυλο-CoA καρβοξυλάσης (ACC), της ATP κιτρικής λυάσης (ACL), επηρεάζεται άμεσα από τη SREBP-1 (Shimano et al., 1999).

Η συσσώρευση λιπιδίων στο λιπώδη ιστό εξαρτάται από τα λιπίδια του πλάσματος τα οποία προέρχονται από την ηπατική λιπογένεση και από τη συγκέντρωση των λιπιδίων που απορροφώνται μέσω της διατροφής. Εκτιμάται ότι το 80-85% των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο λιπώδη ιστό κρεοπαραγωγών ορνίθων προέρχεται από την ηπατική λιπογένεση ή από τη διατροφή μέσω της εντερικής απορρόφησης. Επομένως η αύξηση του λιπώδους ιστού εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, τα οποία μεταφέρονται στους διάφορους ιστούς ως συστατικά των λιποπρωτεϊνών (Hermier, 1997). Οι λιποπρωτεΐνες είναι η κύρια μορφή μεταφοράς των λιπιδίων που συντίθενται στο ήπαρ ή προέρχονται από την τροφή. Αποτελούν μακρομοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών, φωσφορολιπιδίων και υδρόφοβων λιπιδίων, όπως τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης.

Οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoproteins- VLDL) και οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoproteins-HDL) είναι οι δύο κύριες μορφές λιποπρωτεϊνών που συντίθεται στο ήπαρ. Οι HD λιποπρωτεΐνες έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια, σε αντίθεση με τις VLD λιποπρωτεΐνες, που ενσωματώνουν και το μεγαλύτερο μέρος των τριγλυκεριδίων που κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος (Griffin et al., 1988). Επομένως, οι VLD λιποπρωτεΐνες είναι οι κύριοι μεταφορείς των τριγλυκεριδίων και ο έλεγχος του μεταβολισμού τους μπορεί να συμβάλλει στη μείωση εναπόθεσης του λίπους. Όταν ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται η ηπατική λιπογένεση είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό έκκρισης των VLD λιποπρωτεϊνών, τα τριγλυκερίδια συσσωρεύονται στο ήπαρ προκαλώντας στεάτωση. Επίσης, οι Tarlow et al., (1977) διαπίστωσαν ότι η ινσουλίνη και η θυροξίνη είχαν θετική επίδραση στην παραγωγή VLD λιποπρωτεϊνών, σε ηπατοκύτταρα που απομονώθηκαν από νεαρά ορνίθια, ενώ η γλυκαγόνη είχε το αντίθετο αποτέλεσμα.

Η συγκέντρωση των VLD λιποπρωτεϊνών αυξάνεται μετά τη χορήγηση τροφής (Leclercq, 1984), ενώ διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ δύο επιλεγόμενων σειρών ορνιθίων. Η μία επιλεγόταν ως προς την εναπόθεση λίπους και η άλλη ως προς την εναπόθεση μυών με τη 'λιπώδη' σειρά να εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Η συγκέντρωση των VLD λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα παρουσιάζει υψηλό συντελεστή συσχέτισης με την εναπόθεση λίπους στο σώμα των ορνιθίων (Whitehead et al., 1982·Griffin et al., 1982).

Τα λιπίδια και ειδικότερα τα τριγλυκερίδια αποθηκεύονται στα λιποκύτταρα, στα ηπατοκύτταρα και στα ωοκύτταρα. Το λίπος που αποθηκεύεται στα ωοκύτταρα σχετίζεται με τη λεκιθογένεση και την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου. Ο λιπώδης ιστός χρησιμοποιείται κυρίως σαν αποθήκη λίπους και η λιπογένεση που συντελείται σ' αυτόν είναι πολύ περιορισμένη (Hermier, 1997). Η αποθήκευση των τριγλυκεριδίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των λιπιδίων του πλάσματος. Το ήπαρ διοχετεύει όλους τους ιστούς με λιπίδια.

Τα εντερικά και ηπατικά λιπίδια εκκρίνονται ως λιποπρωτεΐνες. Η εξωηπατική πάχυνση των πτηνών εξαρτάται από 1) το ρυθμό σύνθεσης και έκκρισης των λιποπρωτεϊνών και 2) τον ενδοαγγειακό καταβολισμό τους, ο οποίος οδηγεί στην πρόσληψη λιπιδίων και στην αποθήκευσή τους στο λιπώδη ιστό.

## 🚧 ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η πέψη των λιπιδίων, κυρίως τριγλυκεριδίων, στο έντερο περιλαμβάνει την μερική υδρόλυσή τους, την απορρόφησή τους και την επανασυναρμολόγησή τους σε πολύ μεγάλα μόρια λιποπρωτεϊνών. Το εντερικό λεμφικό σύστημα στα πτηνά είναι ελάχιστα ανεπτυγμένο και γι' αυτό οι λιποπρωτεΐνες εκκρίνονται απευθείας στην πύλη του ήπατος και ονομάζονται πυλαιομικρά (Bensadoun & Rothfield 1972). Το μέγεθός τους με μέση διάμετρο περίπου 150 nm, και η σύνθεσή τους που κατά 90% είναι τριγλυκερίδια, είναι παρόμοια με εκείνα των χυλομικρών στα θηλαστικά (Griffin et al., 1982). Βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα αναπτυσσόμενα ορνίθια, ενώ απουσιάζουν από το πλάσμα σε περιπτώσεις νηστείας (Hermier, 1997). Σε αντίθεση, στα θηλαστικά τα χυλομικρά, απελευθερώνονται πρώτα στο λεμφικό σύστημα και από εκεί μέσω του θωρακικού πόρου στο φλεβικό αίμα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων της τροφής (έως και 50%) δεν επαναστεροποιείται στον εντερικό βλεννογόνο και απελευθερώνεται στην πυλαία φλέβα συνδεδεμένο με την αλβουμίνη του πλάσματος (Sklan et al., 1984).

## 🚧 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

- ❖ Ηπατική Λιπογένεση: Η εκ νέου σύνθεση των λιπαρών οξέων στα πτηνά, όπως και στα θηλαστικά, εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των υδατανθράκων οι οποίοι μέσω του μεταβολισμού τους θα οδηγήσουν στο σχηματισμό του ακέτυλο-CoA. Μετά την λήψη της τροφής η ινσουλίνη διεγείρει τη δράση των βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στη λιπογένεση δηλαδή της μηλικής αφυδρογονάσης (MDH) και της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS). Στις όρνιθες ωοπαραγωγής η ηπατική λιπογένεση έχει αυξηθεί σημαντικά από τα οιστρογόνα για να καλυφθούν οι ανάγκες λεκιθογένεσης. Παρότι τα κύρια προϊόντα της εκ νέου ηπατικής λιπογένεσης είναι τα τριγλυκερίδια, το ήπαρ είναι και το κύριο όργανο σύνθεσης της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων. Αυτά τα λιπίδια μαζί με τις πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά των λιποπρωτεϊνών (Hillgartner et al., 1995).
- ❖ Ρύθμιση έκκρισης των λιποπρωτεϊνών: Πολύ λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της σύνθεσης των λιποπρωτεϊνών και την έκκρισή τους στο ήπαρ των πτηνών. Οι

βασικές έρευνες των Tarlow et al. (1977) σχετικά με τα ηπατοκύτταρα έδειξαν ότι η ινσουλίνη ενισχύει τόσο την εκ νέου λιπογένεση όσο και την σύνθεση των VLD λιποπρωτεϊνών ενώ η θυροξίνη και η γλυκαγόνη έχουν αντίθετα αποτελέσματα. Συνεπώς, το ορμονικό πλαίσιο πιθανόν να είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επιδρά στον ρυθμό της ηπατικής λιπογένεσης (Mooney & Lane, 1981).

- ❖ Καταβολισμός λιποπρωτεϊνών: Η μεταφορά των τριγλυκεριδίων από τις VLD λιποπρωτεΐνες, και από τα πυλαιομικρά εάν υπάρχουν, στο λιπώδη ιστό περιλαμβάνει τον καταβολισμό τους από την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Η λιποπρωτεϊνική λιπάση καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια εισέρχονται στους παρακείμενους ιστούς, και στην περίπτωση του λιπώδους ιστού, επανεστεροποιούνται και αποθηκεύονται ως τριγλυκερίδια στα λιποκύτταρα (Hermier, 1997). Η λιποπρωτεϊνική λιπάση συντίθεται στα λιποκύτταρα, στους μυς καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων, αλλά μόνο το τμήμα του ενζύμου το οποίο έχει προσκολληθεί στην επιφάνεια των τριχοειδών αγγείων είναι λειτουργικά ενεργό. Ακόμη, η LPL, βρίσκεται ισχυρά συνδεδεμένη με τις υδατανθρακικές ομάδες των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών του λιπώδους και του μυϊκού ιστού (Ρογδάκης, 1991).
- ❖ Ρύθμιση δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL): Στα θηλαστικά μετά την λήψη της τροφής, η δράση της LPL είναι αυξημένη στο λιπώδη ιστό και μειωμένη στους μυς, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λίπους. Το αντίθετο συμβαίνει στα ζώα που βρίσκονται σε κατάσταση νηστείας. Στα πτηνά η δράση της LPL επηρεάζεται λιγότερο από τη θρεπτική κατάσταση (Hermier et al., 1984). Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την ορμονική ρύθμιση της LPL στα πτηνά. Η ενεργότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στο λιπώδη ιστό των ορνίθων αυξάνεται με την επίδραση της ινσουλίνης (Borron et al., 1979), ενώ τόσο η σύνθεση όσο και η ενεργότητά της, σε ορνίθια λιποκύτταρα *in vitro*, περιορίζεται από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) (Bensadoun & Martin 1986). Η αυξημένη ενεργότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης δε σχετίζεται οπωσδήποτε και με την αύξηση της εναπόθεσης τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό (Hermier, 1997). Οι Griffin et al. (1987) διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα VLD λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των VLD λιποπρωτεϊνών, αυξάνεται

και ο ρυθμός υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων των λιποπρωτεϊνών από την λιποπρωτεϊνική λιπάση και η παροχή λιπαρών οξέων στο λιποκύτταρο.

### **1.3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΑ ΠΤΗΝΑ**

#### Σύνθεση του σιτηρεσίου

Οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες που συνθέτουν το σιτηρέσιο, συμβάλλουν μαζί με το ενδοκρινικό σύστημα σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων της λιπογένεσης, οι οποίες προέρχονται από αυτά τα θρεπτικά συστατικά (Clark & Abraham, 1992). Οι διατροφικοί παράγοντες θα μπορούσαν πιθανόν να ρυθμίζουν την ενζυμική δραστηριότητα μέσω οποιουδήποτε συνδυασμού τους επηρεάζοντας τις διαδικασίες μετάφρασης και μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπογένεση. (Hesketh et al., 1998).

Η αυξημένη χορήγηση πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο των πτηνών, οδηγεί σε μείωση της εκ νέου λιπογένεσης καθώς και σε μειωμένη δράση των ενζύμων λιπογένεσης (Rosebrough et al., 1989). Επίσης προκαλεί αύξηση της θυροξίνης (T4) και μείωση της τριωδοθυρονίνης (T3) και της αυξητικής ορμόνης (Rosebrough et al., 1990). Ο Donaldson (1985) ανέφερε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης πρωτεϊνών και σωματικού λίπους στα κοτόπουλα. Ο Summers et al. (1992) πρότεινε ότι η σχέση μεταξύ σωματικού λίπους και περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε πρωτεΐνες θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση την ποσότητα των απαραίτητων αμινοξέων που υπάρχουν στο σιτηρέσιο.

Οι ωοπαραγωγές όρνιθες που διατρέφονται με σιτηρέσιο πλούσιο σε λίπη ενσωματώνουν λιγότερο οξικό οξύ στα λιπίδια του ήπατος απ'ότι οι όρνιθες οι οποίες έχουν διατραφεί με σιτηρέσιο φτωχό σε λίπη (Weiss et al., 1967). Αυτό οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας της ακέτυλο- CoA καρβοξυλάσης και επομένως σε μειωμένο ρυθμό λιπογένεσης. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Weiss et al. (1967), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η αύξηση λίπους στο σιτηρέσιο ωοπαραγωγών ορνίθων από 2-10% έχει σαν αποτέλεσμα και την μειωμένη δράση πολλών λιπογόνων ενζύμων όπως του μηλικού και του κιτρικού κατά 50 %.

Η ηπατική λιπογένεση αυξάνεται όταν η περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε υδατάνθρακες είναι υψηλή ( Lyon et al., 1952) και μειώνεται όταν το ζώο βρίσκεται

σε κατάσταση νηστείας (Lyon et al., 1952 · Butterworth et al., 1966) ή όταν του έχει χορηγηθεί σιτηρέσιο πλούσιο σε λίπη (Bortz et al., 1963). Ο καθοριστικός παράγοντας περιορισμού του ρυθμού λιπογένεσης είναι η ακέτυλο CoA καρβοξυλάση (Ganguly, 1960)

Η νηστεία αναστέλλει τη λιπογένεση και αυξάνει τη λιπόλυση (Goodrich, 1968). Ο ρυθμός λιπογένεσης μειώνεται ταχύτερα στα μονογαστρικά από ό,τι στα μηρυκαστικά. Στα πτηνά ο βαθμός λιπογένεσης κατέρχεται στο ελάχιστο επίπεδό του 24 ώρες περίπου μετά την έναρξη της νηστείας. Ανάλογες αλλαγές ως αντίδραση στη νηστεία και στην επαναχορήγηση τροφής παρουσιάζει και η ενεργότητα των διάφορων λιπογόνων ενζύμων, όπως των NADP-αφυδρογονασών και της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA. Οι μηχανισμοί που προκαλούν τις παραπάνω αλλαγές δεν έχουν διευκρινιστεί, αν και μάλλον φαίνεται ότι είναι ενδοκρινικής φύσεως (Rogdakis et al., 1997).

#### Ενδοκρινικό σύστημα

Σημαντικές επιδράσεις στο μεταβολισμό του λίπους ασκεί η ινσουλίνη. Γενικά η ινσουλίνη προάγει τη λιπογένεση και αναστέλλει τη λιπόλυση. Επίσης, αυξάνει την ενεργότητα πολλών ενζύμων της λιπογένεσης όπως της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA (Pearce, 1974).

Η σημαντικότερη ορμόνη η οποία ρυθμίζει την ανάπτυξη στα πτηνά είναι η αυξητική (GH), η οποία παρουσιάζει άμεσες επιδράσεις στη λιπόλυση και τη λιπογένεση. Ο ρυθμιστικός της ρόλος, όμως, όσον αφορά την ανάπτυξη των μυών και των οστών λαμβάνει χώρα μέσω των παραγόντων IGF-I και IGF-II (Insulin-like Growth Factors) (Decuyper & Buyse, 2005). Η δράση του IGF-I παράγοντα συνίσταται στην αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης και αμινοξέων από τα κύτταρα όπως επίσης και της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ παρουσιάζει αρνητική επίδραση στην εναπόθεση λίπους (Duclos et al., 1999). Ο IGF-II παράγοντας έχει βρεθεί ότι ενισχύει την εναπόθεση λίπους, επομένως οι δύο πρωτεϊνικοί παράγοντες έχουν ανταγωνιστική δράση.

Σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του λιποκυττάρου ασκούν και οι κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη). Η σύνδεση των κατεχολαμινών στους υποδοχείς των λιποκυττάρων ενεργοποιεί το ένζυμο αδενυλοκυκλάση, της μεμβράνης του λιποκυττάρου, με αποτέλεσμα την παραγωγή της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP).

Η γλυκαγόνη είναι μία ακόμα ορμόνη η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό του λιποκυττάρου. Έχει έντονη λιπολυτική δράση στο λιπώδη ιστό. Επίσης, μαζί με τη cAMP εμποδίζουν τη δράση του μηλικού ενζύμου, της ATP κιτρικής λυάσης και της συνθετάσης των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (Maret et al., 2000). Η αυξημένη συγκέντρωση αυτής της ορμόνης είναι ενδεικτική για την ύπαρξη stress στα πτηνά .

Τα επίπεδα των φυλετικών στεροειδών στο αίμα των ορνιθίων αυξάνονται σημαντικά κατά την ηλικία της γενετήσιας ωρίμανσης και ασκούν σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του λίπους. Η τεστοστερόνη μειώνει σημαντικά τα επίπεδα αποθεμάτων του λίπους στα αρσενικά ορνίθια, ενώ τα οιστρογόνα αυξάνουν την εναπόθεση λίπους στο σώμα των ορνιθίων (Snapir et al., 1983). Η οιστραδιόλη-17β προάγει σημαντικά τη σύνθεση λιπαρών οξέων, το σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών και την απελευθέρωσή τους από τα ηπατοκύτταρα (Dashti et al., 1983). Έπειτα από τη χορήγηση οιστρογόνων σε αρσενικά ορνίθια, παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και αύξηση της εναπόθεσης λίπους, παρόλο που η ένταση αυτών των φαινομένων εξαρτήθηκε σημαντικά από τη σύσταση της χορηγούμενης τροφής (Akiba et al., 1982).

#### Ηλικία

Κατά την περίοδο επώασης των εμβρύων της όρνιθας ο ρυθμός της ηπατικής λιπογένεσης είναι χαμηλός (Kilsheimer et al., 1960). Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω της υψηλής ποσότητας λίπους (λέκιθος) που διατίθεται για το έμβρυο. Κατά την εκκόλαψη ο νεοσσός λαμβάνει υψηλή ποσότητα υδατανθράκων και μικρή ποσότητα λιπιδίων μέσω της διατροφής και κατά τη διάρκεια αυτής της πρώιμης μεταγεννητικής περιόδου η λιπογένεση αυξάνεται ραγδαία. Η λιπογένεση που λαμβάνει χώρα στο ήπαρ του νεοσσού μέσω της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη και με τη δράση των ενζύμων λιπογένεσης όπως η ATP-κιτρική λυάση, το μηλικό ένζυμο και η ακέτυλο-CoA καρβοξυλάση, αυξάνεται ραγδαία κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο και φτάνει σ'ένα μέγιστο κατά την 7<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> μέρα ζωής του (Goodridge, 1968a · Ryder, 1970). Ο ρυθμός λιπογένεσης διατηρείται σ'αυτά τα επίπεδα τουλάχιστον μέχρι την ηλικία των 4 εβδομάδων. Αυτή η αύξηση της λιπογένεσης μετά την εκκόλαψη, μοιάζει με την περίπτωση των απογαλακτισθέντων αρουραίων, όπου πάλι υπάρχει αλλαγή από ένα υψηλό επίπεδο λιπιδίων, χαμηλής



περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες σε μια πλούσια σε υδατάνθρακες, χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά διατροφή (Ballard & Hanson, 1967 · Taylor et al., 1967).

#### 🚩 Φύλο

Ο Pearce, (1971) αναφέρει ότι με την έναρξη της σεξουαλικής ωριμότητας και της ωοτοκίας της πουλάδας, παρατηρείται αύξηση στην ηπατική δραστηριότητα της ATP-κιτρικής λυάσης και του μηλικού ενζύμου, ενώ την ίδια στιγμή δεν παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στη δράση των ενζύμων λιπογένεσης στον κόκορα. Στις ωοτόκες όρνιθες κατά την περίοδο της ωοτοκίας αυξάνεται η ηπατική λιποσύνθεση λόγω της αυξημένης έκκρισης των οιστρογόνων (Pownall, 2001· Rodoman et al., 2001). Οι Leveille et al (1968) και Leveille (1969) ανέφεραν ότι ο ρυθμός της ηπατικής λιπογένεσης στην πουλάδα είναι παρόμοιος με εκείνον της ωοτόκου όρνιθας και οι Husbands & Brown (1965) παρατήρησαν ότι ο ρυθμός της ηπατικής λιπογένεσης στον ενήλικο κόκορα είναι μικρότερος από αυτόν της ωοτόκου όρνιθας. Οι Leveille et al. (1968) υποθέτουν ότι ο ρυθμός λιπογένεσης είναι υψηλός στους νεοσσούς, στους κόκορες μειώνεται με την ηλικία ενώ στην ωοτόκο όρνιθα λόγω της απαίτησης για λίπος κατά την παραγωγή αυγών, παραμένει σε υψηλά επίπεδα.

#### ❖ Ενζυμική ενεργότητα

Με την αύξηση της ηλικίας και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες σε ένα λιποκύτταρο αυξάνεται η περιεκτικότητά του σε λίπος και ελαττώνεται ανάλογα η μάζα του ενεργού πρωτοπλάσματος. Κατά συνέπεια, η μεταβολική του δραστηριότητα αντικατοπτρίζεται καλύτερα στην ειδική ενεργότητα ενός ενζύμου (εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες ανά χιλιοστόγραμμα διαλυτής πρωτεΐνης) παρά στην γενική (εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες ανά γραμμάριο ιστού). Ο Γκολιομύτης (2000) αναφέρει ότι η ενζυμική ενεργότητα της μηλικής αφυδρογονάσης (NADP-MDH) και της ισοκιτρικής (NADP-ICDH) στο λιπώδη ιστό, αρχίζει να διαφοροποιείται μετά την ηλικία των 28 ημερών περίπου των ορνιθίων. Έκτοτε, καθόλη την υπόλοιπη διάρκεια ζωής τους, η ενεργότητα της NADP-ICDH διαμορφώνεται σε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από αυτήν της NADP-MDH. Ωστόσο, η ενεργότητα και των δύο ενζύμων είναι μικρή, ώστε η παραγωγή ανηγμένης δύναμης με τη μορφή NADPH, για την αναγωγή του ακετύλο-CoA σε λιπαρά οξέα στο λιπώδη ιστό, να θεωρείται μικρή. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με

την υπόθεση του Goodridge (1968) και των O'Hea et al., (1968), ότι ο λιπώδης ιστός στα πτηνά αποτελεί περισσότερο όργανο αποθήκευσης λιπαρών οξέων παρά καθαυτό όργανο λιπογένεσης. Σε μία πρόσφατη εργασία των Griffin et al., (1992) διαπιστώθηκε, επίσης, μικρός μόνο ρυθμός λιπογένεσης στον κοιλιακό λιπώδη ιστό ορνιθίων, ο οποίος προφανώς δε σχετίζεται με το ρυθμό λιπογένεσης στο ήπαρ.

Στο ήπαρ, η ενεργότητα των αφυδρογονασών είναι υψηλότερη απ' ότι στον κοιλιακό λιπώδη ιστό. Ο Γκολιομύτης (2000) διαπίστωσε ότι έως την ηλικία των 28 ημερών η NADP-MDH ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από ότι η ενεργότητα της NADP-ICDH. Μετά την ηλικία αυτή η ενεργότητα των δύο ενζύμων άρχισε να διαφοροποιείται αλλά προς αντίθετη κατεύθυνση απ' ότι στο λιπώδη ιστό. Ενώ στο λιπώδη ιστό η ενεργότητα της NADP-ICDH διαμορφώθηκε σε στατιστικώς υψηλότερα επίπεδα, στο ήπαρ συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Έχει διαπιστωθεί ότι η διατροφή επιδρά σημαντικά στην ενεργότητα της αφυδρογονάσης του μηλικού. Οι Yeh et al., (1970) διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά μετά από διακοπή χορήγησης τροφής για 24 ώρες.

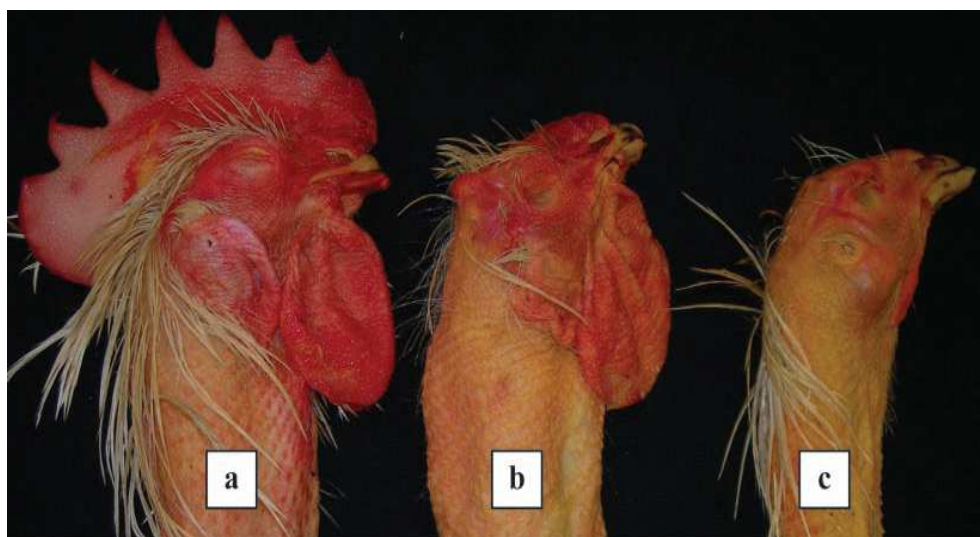
Από τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού-πυροσταφυλικού, η μηλική αφυδρογονάση προσφέρει το μεγαλύτερο μέρος NADPH που απαιτείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού συμμετέχει σε πολύ μικρότερο βαθμό (Goodridge, 1968a · Shapira et al., 1978). Το συμπέρασμα αυτό τεκμηριώνεται και από τον υψηλό θετικό συντελεστή συσχέτισης (0,98) που προσδιόρισαν οι Tanaka et al., (1983) μεταξύ της ενεργότητας της μηλικής αφυδρογονάσης και της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

Τα ένζυμα του κύκλου των φωσφοροπεντοζών σύμφωνα με τις εργασίες των Hood et al., (1982), Shapira et al., (1978), Tanaka et al., (1983) και Kouba et al., (1992) έχουν χαμηλή ενζυμική ενεργότητα τόσο στο λιπώδη ιστό όσο και στο ήπαρ των πτηνών. Οι χαμηλές τιμές της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορογλυκόζης και της αφυδρογονάσης του 6-φωσφορογλυκονικού, αποδεικνύουν την μικρή προσφορά των ενζύμων του κύκλου των φωσφοροπεντοζών στην παραγωγή της απαραίτητης, για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, ποσότητας NADPH (Shapira et al., 1978). Σε συμφωνία είναι και τα αποτελέσματα των Tanaka et al., (1983) οι οποίοι βρήκαν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων και της ενεργότητας των ενζύμων του κύκλου των φωσφοροπεντοζών στο ήπαρ των

ορνιθίων, με εξαίρεση την αφυδρογονάση του μηλικού η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

#### ✚ Ευνουχισμός

Τα ευνουχισμένα αρσενικά ορνίθια ονομάζονται ‘καπόνια’ (capons). Η αφαίρεση των όρχεων οδηγεί στη δραστική μείωση των ανδρογόνων και τη θηλυκοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του αρσενικού ορνιθίου. Λόγω της συνακόλουθης έλλειψης ανδρογόνων τα δευτερογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά, όπως το λειρί, το κάλλαιο, και η επιθετική συμπεριφορά εκφυλίζονται (εικόνα 3). Τα καπόνια συσσωρεύουν λίπος στο σώμα τους, το οποίο ενισχύει τη γεύση του κρέατος, την υφή του και το καθιστά χυμώδες σε σύγκριση με τα μη ευνουχισμένα ορνίθια (Chen et al., 2000b, 2005, 2006).



**Εικόνα 3.** Το λειρί και το κάλλαιο σε κόκορα (α), σε μερικώς (b) και πλήρως ευνουχισμένο (c) ορνίθιο.

Η επέμβαση του ευνουχισμού στα αρσενικά ορνίθια θα πρέπει να πραγματοποιείται πριν από τη γενετήσια ωρίμανση, ώστε να έχει επίδραση στα χαρακτηριστικά του σφαγίου και του κρέατος. Δεδομένου ότι η γενετήσια ωρίμανση στα ορνίθια επιτυγχάνεται περίπου στους 3-4 μήνες, τίθεται ένα χρονικό όριο ως προς την ηλικία ευνουχισμού. Συνήθως, θεωρείται προτιμότερο ο ευνουχισμός να εφαρμόζεται, σε όσο το δυνατόν μικρότερη ηλικία, ώστε τα ορνίθια να έχουν το χρόνο να ανακάμψουν από την καταπόνηση της επέμβασης. Ωστόσο, ο χρόνος ευνουχισμού εξαρτάται κυρίως από το υβρίδιο καθώς φαίνεται ότι υπάρχει

αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της ηλικίας του ευνουχισμού και της ταχύτητας ανάπτυξης του υβριδίου ( Fennell & Scanes 1992).

Ο ευνουχισμός έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση των ανδρογόνων και συγκεκριμένα της τεστοστερόνης στο πλάσμα του αίματος και οδηγεί στη συσσώρευση λίπους στο λιπώδη (Cason et al., 1988 · Chen et al., 2000a, 2000b, 2005, 2006a) στον υποδόριο και στον ενδομυϊκό ιστό, ενώ επίσης οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων του αίματος. (Chen et al., 2005, 2006a). Η αυξημένη, δε, εναπόθεση ενδομυϊκού λίπους έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό η ποιότητα του κρέατος και συγκεκριμένα το χρώμα και η τρυφερότητα (Hsu & Lin, 2003). Οι Chen et al. (2005) βρήκαν ότι τα καπόνια έχουν διαφορετικό προφίλ λιποπρωτεϊνών το οποίο οδηγεί σε αυξημένη αποθήκευση των λιπιδίων. Ο Tsai (2004) ανέφερε ότι ο ευνουχισμός επιφέρει αύξηση των ενεργειακών αποθεμάτων του οργανισμού μέσω της συσσώρευσης του λίπους και της μειωμένης πεπτικότητας των λιπιδίων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων του αίματος μπορεί να σχετίζεται με τη ρύθμιση της ηπατικής λιπογένεσης.

Επομένως, ο ευνουχισμός αυξάνει τη συγκέντρωση των ηπατικών λιπιδίων και της τριακυλογλυκερόλης ενώ οδηγεί σε μείωση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (Chen et al., 2005). Αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου της μηλικής αφυδρογονάσης και ευνοεί την ηπατική λιπογένεση. Σε αντίθεση η χορήγηση τεστοστερόνης οδηγεί σε μείωση της ηπατικής λιπογένεσης και σε μειωμένη συσσώρευση των λιπιδίων.

Ο ευνουχισμός, αν και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση εναπόθεσης λίπους στο σφάγιο, δε συντελεί πάντα στην σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα των πτηνών (Snapir et al., 1974 · Miller et al., 1985). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη τους, οι Snapir et al. (1983) αναφέρουν ότι ο ευνουχισμός είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων αλλά όχι της συγκέντρωσης της γλυκερόλης. Οι Chen et al. (2005) παρατήρησαν ότι ο ευνουχισμός, αν και δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις της χοληστερόλης και της HDL- χοληστερόλης, εντούτοις παρουσιάστηκε η τάση αύξησης της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων. Επίσης, αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης σε ευνουχισμένους επίμυες βρήκαν οι Haugh et al. (1984). Κατά συνέπεια, από το σύνολο των λιποπρωτεϊνών, τα τριγλυκερίδια (VLDL) φαίνεται να αντιδρούν περισσότερο έντονα αυξητικά μετά τον ευνουχισμό. Άλλωστε, αναφέρεται ότι γενετικοί ή διατροφικοί παράγοντες που έχουν ως συνέπεια την αύξηση της

εναπόθεσης λίπους στο σπύαγιο συσχετίζονται θετικά με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα (Hermier, 1997).

## 1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΥΝΟΥΧΙΣΜΟΥ

### *I. Ένζυμα λιπογένεσης*

Ο ευνουχισμός αυξάνει την δραστικότητα της μηλικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ καθώς και την έκφραση του γονιδίου της μηλικής αφυδρογονάσης σε επίπεδο mRNA. Στα πτηνά η μηλική αφυδρογονάση καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του μηλικού οξέος και ταυτόχρονα οδηγεί στη μείωση της NADP η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκ νέου σύνθεση των λιπαρών οξέων. Ο Legrand et al. (1987) ανέφεραν ότι το μηλικό ένζυμο στο ήπαρ συσχετίζεται θετικά με το ρυθμό σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Οι Chen et al. (2006a) ανέφεραν ότι ο ευνουχισμός δεν είχε επίδραση στη δράση του ενζύμου της κιτρικής αφυδρογονάσης (CCE) ούτε στο ένζυμο της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορογλυκόζης (G6PD). Οι Grunder et al. (1987) διαπίστωσαν ότι η δράση της μηλικής και της κιτρικής αφυδρογονάσης ήταν μεγαλύτερη στα θηλυκά κοτόπουλα απ'ότι στα αρσενικά. Οι Tanaka et al. (1986) επίσης έδειξαν ότι τα οιστρογόνα του αίματος συσχετίζονται θετικά με τη δράση της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS), της MDH και της CCE στο ήπαρ καθώς και με τα λιπίδια που βρίσκονται στη κυκλοφορία του αίματος. Αυτό υποδεικνύει ότι οι μηχανισμοί συγκέντρωσης του λίπους στο σώμα των ευνουχισμένων ορνιθίων διαφέρουν από αυτούς των θηλυκών.

Σε σχέση με την αφυδρογονάση του ισοκιτρικού, η αφυδρογονάση του μηλικού οξέος φαίνεται ότι έχει έναν πιο σημαντικό ρόλο στη λιπογένεση των πτηνών (Richards et al., 2003) και η ενεργότητά της παρουσιάζεται αυξημένη στα ευνουχισμένα ορνιθία. Οι Chen et al. (2007) αναφέρουν ότι ο ευνουχισμός ορνιθίων της φυλής Leghorn είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος ενώ δεν επηρέασε τις ενεργότητες της συνθετάσης των λιπαρών οξέων και της ATP-κιτρικής λύασης. Επίσης, οι Haugh et al. (1985) παρατήρησαν ότι ο ευνουχισμός επίμυων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος.

Αναφορικά με την επίδραση του φύλου των ορνιθίων στις ενεργότητες των ενζύμων που συμμετέχουν στη λιπογένεση, οι Grunder et al. (1987) αναφέρουν ότι οι

ενεργότητες της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος και της ATP κιτρικής λυάσης ήταν αυξημένες στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά ορνίθια, καθώς η εναπόθεση λίπους είναι περισσότερη στα θηλυκά άτομα λόγω της δράσης των οιστρογόνων. Ο Pearce (1972) παρατήρησε ότι η ενεργότητα της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος αυξήθηκε σημαντικά στο ήπαρ πουλάδων Leghorn όταν εισήλθαν στο στάδιο της ωοπαραγωγής κατά το οποίο οι ανάγκες λιποσύνθεσης είναι αυξημένες. Σε προηγούμενο πειραματισμό, όμως, στον οποίο οι Pearce και Brown (1971) χορήγησαν τεστοστερόνη σε πουλάδες Leghorn, δεν παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές στην ενεργότητα της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος.

Όπως είναι φανερό, οι μεταβολές της ενεργότητας της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος δεν είναι πάντα ανάλογες με τις μεταβολές στο ρυθμό της λιπογένεσης. Ο Hermier (1997), συμπέρανε ότι η αυξημένη λιποσύνθεση στα πτηνά δε συνεπάγεται πάντα τη σημαντική αύξηση της ενεργότητας της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, ενώ οι ενεργότητες της συνθετάσης των λιπαρών οξέων και της ATP-κιτρικής λυάσης φαίνεται ότι αντιδρούν πιο έντονα στην αύξηση του ρυθμού λιποσύνθεσης.

## II. Εμφάνιση-συμπεριφορά

Το λοφίο και τα λειρία μειώνονται σε μέγεθος και αποκτούν ωχρή όψη, ενώ οι λαρυγγισμοί ομοιάζουν με αυτούς των ορνίθων. Ταυτόχρονα, προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στη συμπεριφορά. Τα ορνίθια χάνουν την επιθετικότητα των αρσενικών, γίνονται λιγότερο ενεργητικά και αποκτούν ήπιο χαρακτήρα. Οι προστριβές μεταξύ των ατόμων εντός του σμήνους μειώνονται σημαντικά, καθώς παύουν να εκδηλώνονται έντονες συμπεριφορές, όπως είναι η διεκδίκηση της ιεραρχίας και η υπεράσπιση του προσωπικού χώρου.

## III. Ανάπτυξη

Οι μελέτες σχετικά με την επίδραση του ευνουχισμού στο σωματικό βάρος παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι Cason et al. (1988) παρατήρησαν ότι κρεοπαραγωγά ορνίθια που ευνουχίστηκαν κατά την 3<sup>η</sup> εβδομάδα ηλικίας ήταν ελαφρύτερα από το μάρτυρα στην ηλικία των 7 εβδομάδων. Όταν η επίδραση του ευνουχισμού στο σωματικό βάρος μελετήθηκε σε μεγαλύτερες ηλικίες, οι οποίες κυμαίνονταν από 12 έως 32 εβδομάδες δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο σωματικό βάρος μεταξύ αρσενικών και ευνουχισμένων ορνιθίων (Chen et al., 2005 · Miguel et al., 2008 · Symeon et al., 2010). Σε άλλες μελέτες, όμως παρατηρήθηκε θετική επίδραση του ευνουχισμού στο σωματικό βάρος (Lin & Hsu,

2002). Οι διαφοροποιήσεις που παρουσιάζονται θα πρέπει να οφείλονται πρωτίστως στο γενετικό υλικό και δευτερευόντως στις διαφορετικές συνθήκες εκτροφής ή/και διατροφής.

#### IV. Σύσταση του σφαγίου

Οι κυριότερες επιδράσεις του ευνουχισμού στη σύσταση του σφαγίου, οι οποίες επιβεβαιώνονται από τη βιβλιογραφία είναι η αύξηση του βάρους του στήθους (Tor et al., 2002 · Miguel et al., 2008) και η μείωση του βάρους του ποδιού (Tor et al., 2002). Όσον αφορά την αύξηση του βάρους του στήθους είναι πιθανόν ότι η μείωση της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης προκαλεί αλλαγές στο μεταβολισμό, οι οποίες ευνοούν την πρωιμότερη ανάπτυξη του στήθους, όπως έχει παρατηρηθεί στις όρνιθες ωοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Muriel Duran, 2004). Η μείωση του βάρους του ποδιού πιθανότατα οφείλεται στην μείωση της σαρκογονίας στα ευνουχισμένα ορνίθια λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης.

Μία έντονη επίδραση του ευνουχισμού είναι η αύξηση της εναπόθεσης λίπους στο σφάγιο τόσο με τη μορφή κοιλιακού όσο και υποδόριου λίπους (Tor et al., 2002 · Chen et al., 2005 · Miguel et al., 2008), αποτέλεσμα που αναμένεται λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης. Η αύξηση του κοιλιακού λίπους δεν παρουσιάζει πρακτικά ενδιαφέρον διότι το μεγαλύτερο μέρος του απορρίπτεται κατά τη διάρκεια της σφαγής. Αντίθετα, η αύξηση του υποδόριου λίπους φαίνεται ότι συμβάλει τα μέγιστα στη διαφοροποίηση της ποιότητας του σφαγίου.

#### V. Ποιότητα κρέατος

Ο ευνουχισμός σε συμφωνία με τη γενικότερη τάση αύξησης της εναπόθεσης λίπους στο σφάγιο, αυξάνει σημαντικά την ποσότητα του ενδομυϊκού λίπους (Tor et al., 2002 · Miguel et al., 2008 · Symeon et al., 2010). Η αύξηση αυτή έχει έμμεσες αλλά ιδιαίτερα σημαντικές επιδράσεις: α) διαφοροποιεί σημαντικά το χρώμα του κρέατος καθώς αυξάνει την ένταση του κίτρινου χρώματος και τη φωτεινότητα και μειώνει την ένταση του ερυθρού χρώματος. β) Συνήθως, η αυξημένη περιεκτικότητα ενός μυός σε ενδομυϊκό λίπος συνδέεται με χαμηλότερες τιμές για τη δύναμη διάτμησης, όμως το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται πάντοτε στα ευνουχισμένα ορνίθια. Είναι γνωστό ότι η τρυφερότητα εξαρτάται επίσης από την ηλικία σφαγής, τον τύπο των μυϊκών ινών και την ποσότητα και ποιότητα του κολλαγόνου που περιέχει. γ) Η αύξηση της περιεκτικότητας ενός μυός σε ενδομυϊκό λίπος μπορεί θεωρητικά να επηρεάσει σημαντικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρέατος πέρα από την τρυφερότητά του. Είναι γνωστό ότι το λίπος είναι φορέας πολλών

αρωματικών ενώσεων οι οποίες είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την γευστικότητα του κρέατος.

## 1.5 ΛΙΠΟΛΥΣΗ

Η εναπόθεση λίπους στο λιπώδη ιστό είναι το αποτέλεσμα τόσο της προσφοράς λιπαρών οξέων μέσω των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών όσο και της πραγματοποιούμενης λιπόλυσης. Κατά την λιπόλυση πραγματοποιείται υδρόλυση των αποθηκευμένων στο λιποκύτταρο τριγλυκεριδίων από την ορμονοευαίσθητη λιπάση. Τα λιπαρά οξέα που παράγονται διοχετεύονται στο αίμα συνδεδεμένα με την αλβουμίνη του πλάσματος (Nir et al., 1988).

Η διαδικασία της λιπόλυσης δραστηριοποιείται όταν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης των λιπαρών οξέων του λιπώδους ιστού για κάλυψη ενεργειακών αναγκών όπως π.χ. στην περίπτωση νηστείας.

Ο ορμονικός έλεγχος της λιπόλυσης γίνεται κυρίως μέσω της γλυκαγόνης, η οποία προκαλεί αύξηση του ρυθμού λιπόλυσης (Goodridge, 1968a · Langslow et al., 1971). Η δράση της γλυκαγόνης έγκειται στο ότι προκαλεί αύξηση του επιπέδου του cAMP που, με την επίδραση της πρωτεϊνικής κινάσης, ενεργοποιεί την ορμονοευαίσθητη λιπάση μέσω της φωσφορυλίωσης. Τα λιποκύτταρα των πτηνών μπορούν και συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες cAMP απ'ό,τι τα λιποκύτταρα των θηλαστικών (Maglieri et al., 1975), και αυτό αποτελεί ένα λόγο για τον οποίο τα λιποκύτταρα των πτηνών είναι πιο ευαίσθητα στη γλυκαγόνη απ'ό,τι των θηλαστικών. Σημαντική διαφορά μεταξύ των θηλαστικών και των πτηνών αποτελεί το ότι στα θηλαστικά η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη αποτελούν τις κύριες λιπολυτικές ορμόνες, ενώ στα πτηνά μόνο όταν χορηγηθούν σε πολύ μεγάλες ποσότητες προκαλούν υδρόλυση των τριγλυκεριδίων στο λιποκύτταρο (Langslow, 1972). Επίσης, ενώ η ινσουλίνη στα θηλαστικά παρουσιάζει αντιλιπολυτική δράση, στα πτηνά δεν έχει διαπιστωθεί καμία επίδραση (Langslow et al., 1971). Σύμφωνα με τους Harvey et al., (1977) και η αυξητική ορμόνη παρουσιάζει λιπολυτική δράση σε λιποκύτταρα των πτηνών.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

##### 1.1 Ζωικό Υλικό

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το λιπώδη ιστό και το ήπαρ, από 60 αρσενικά ορνίθια ενός υβριδίου ωοπαραγωγής (Lohmann Silver). Η επέμβαση του ευνουχισμού πραγματοποιήθηκε σε τριάντα ορνίθια την 45<sup>η</sup> ημέρα της ηλικίας τους. Η εκτροφή είχε διάρκεια 34 εβδομάδες και πραγματοποιήθηκαν 3 σφαγές στην ηλικία των 26, 30 και 34 εβδομάδων. Η λήψη νερού και τροφής ήταν κατά βούληση. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τρία σιτηρέσια, αναλόγως του σταδίου ανάπτυξης. Όλα τα σιτηρέσια ήταν σε μορφή τριμμάτων συμπήκτων (crumbles).

##### 1.2 Απομόνωση ολικού RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από το ήπαρ και το λιπώδη ιστό των αρσενικών ορνιθίων ωοπαραγωγής. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα ίδια στάδια και για τους δύο ιστούς με μικρή διαφοροποίηση η οποία και αναφέρεται στην κάθε περίπτωση. Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των τυποποιημένων αντιδραστηρίων Rneasy lipid tissue Kit (Qiagen), τα οποία είναι εξειδικευμένα για την απομόνωση RNA από ιστούς με υψηλή λιποπεριεκτικότητα. Εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρείας, με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, αυξήθηκε η αρχική ποσότητα του λιπώδους ιστού σε 150-200 mg και εφαρμόστηκε το προτεινόμενο στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων με έναν αναστολέα των ριβονουκλεασών (RNase, Qiagen), για την εξασφάλιση καλύτερης ποιότητας απομονωθέντος RNA. Επίσης, η δεοξυριβονουκλεάση (DNase, Qiagen) χρησιμοποιήθηκε στην επεξεργασία του τελικού προϊόντος με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ύπαρξης προσμίξεων ποσοτήτων DNA που θα παρεμπόδιζαν την εφαρμογή της αντίστροφης μεταγραφάσης και της αλυσιδωτής αντίδρασης της

πολυμεράσης (PCR). Η διαδικασία απομόνωσης περιλαμβάνει αναλυτικότερα και για τους δύο ιστούς τα εξής στάδια:

- ❖ Από το ήπαρ λαμβάνονται και ζυγίζονται 100 mg ιστού ενώ από το λιπώδη ιστό 200 mg. Στη συνέχεια και για τους δύο ιστούς ακολουθεί :
- ❖ Ψύξη του δείγματος σε υγρό άζωτο, προκειμένου να ανασταλεί η δράση των ενδογενών RNασών.
- ❖ Λειοτριβίση του δείγματος, μέχρι ο ιστός να κονιορτοποιηθεί πλήρως. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας λαμβάνει χώρα ψύξη του ιστού με την προσθήκη υγρού αζώτου.
- ❖ Προσθήκη 1ml διαλύματος λύσης (Qiazol) των κυτταρικών μεμβρανών και ανάμιξη μέχρι πλήρους ομογενοποίησης του δείγματος.
- ❖ Τοποθέτηση του δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf συνολικού όγκου 1,5 ml.
- ❖ Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου ( $\text{CHCl}_3$ ) και ανάμιξη με έντονη μηχανική ανάδευση για 15 sec.
- ❖ Επώαση για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 15 min στους 4<sup>0</sup>C.
- ❖ Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf (1,5 ml).
- ❖ Προσθήκη 600 μl αιθανόλης (70%) και ανάμιξη με έντονη μηχανική ανάδευση.
- ❖ Μεταφορά 600 μl δείγματος στην παρεχόμενη στήλη RNeasy Mini Spin, η οποία έχει τοποθετηθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf τελικού όγκου 2 ml.
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 8.000 g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος.
- ❖ Επανάληψη των δύο προηγούμενων σταδίων με το υπόλοιπο του δείγματος και τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf τελικού όγκου 2 ml.
- ❖ Προσθήκη 350 μl διαλύματος RW1 στη στήλη.
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 8.000 g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος.

- ❖ Προσθήκη 10 μl διαλύματος DNάσης I και 70 μl διαλύματος RDD σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf και ήπια ανάμιξη.
- ❖ Προσθήκη 80 μl από το παραπάνω μίγμα στη στήλη του ιοντοανταλλάκτη.
- ❖ Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Προσθήκη 350 μl διαλύματος RW1 στη στήλη.
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 8.000 g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος
- ❖ Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE στη στήλη.
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 8.000 g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του διηθήματος.
- ❖ Μεταφορά της στήλης του ιοντοανταλλάκτη, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf των 2 ml.
- ❖ Προσθήκη 50 μl RNase free water (νερό ελεύθερο από RNάσες).
- ❖ Φυγοκέντρηση στα 8.000 g για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποκτηθεί, καθαρό πλέον, το ολικό RNA, το οποίο εκλούεται από τη στήλη του ιοντοανταλλακτή.
- ❖ Διατήρηση του δείγματος στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.3 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του RNA

#### ➤ Φωτομέτρηση

Η καθαρότητα του RNA εκτιμήθηκε με φωτομέτρηση των δειγμάτων με βάση τον υπολογισμό του λόγου της οπτικής τους πυκνότητας στα 260 nm, ως προς την οπτική πυκνότητα τους αντίστοιχα στα 280 nm. Τα δείγματα, προκειμένου να φωτομετρηθούν, αραιώθηκαν τόσο ώστε οι τιμές της οπτικής πυκνότητας να βρίσκονται στο γραμμικό εύρος τιμών του φασματογράφου. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίζεται επίσης και η ποσότητα του RNA λαμβάνοντας υπόψη ότι 40 μg RNA/ml έχουν οπτική πυκνότητα στα 260 nm ίση με 1. Ο λόγος της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος στα 260 nm/280nm αναμένεται να είναι περίπου μεταξύ 1,9 και 2. Σε γενικές γραμμές η διαδικασία που ακολουθήθηκε μπορεί να περιγραφεί ως εξής :

- 100 μl dd H<sub>2</sub>O φωτομετρούνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται
- 10 μl δείγματος διαλύονται σε 90 μl dd H<sub>2</sub>O και τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία

- Ακολουθεί φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) στα 260 nm
- Υπολογισμός του λόγου 260nm/ 280nm, με το οποίο εκτιμάται η καθαρότητα του απομονωθέντος RNA. Η τιμή πρέπει να είναι περίπου 2.
- Η συγκέντρωση του RNA στο δείγμα υπολογίζεται από τον τύπο:  
 $[RNA][\mu g/ml] = ABS_{260nm} \times 40 \mu g/ml \times \text{'παραγοντας διάλυσης'}$  (dilution factor)  
 Όπου 'παραγοντας διάλυσης' (dilution factor) είναι η αναλογία του τελικού όγκου στη κυψελίδα προς τον όγκο του δείγματος που διαλύθηκε για να γίνει η φωτομέτρηση.

➤ Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων RNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων.

Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά με τη βοήθεια μιας χρωστικής που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει με την παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% έως 2% w/v αγαρόζη.

Για την ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι αναγκαία η παρασκευή κάποιων επιπρόσθετων βοηθητικών διαλυμάτων. Τα διαλύματα αυτά είναι: α) Ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TAE (για την υποβοήθηση της κινητικότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο) και β) βρωμιούχο αιθίδιο (ώστε να καταστούν ορατά τα διαχωρισμένα νουκλεϊνικά οξέα υπό την επίδραση της UV).

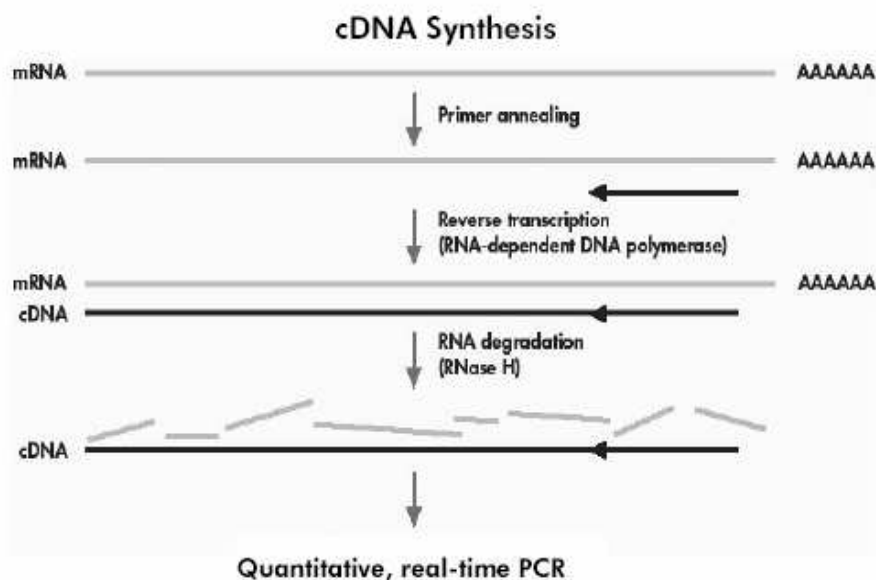
Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

- ❖ Προσθήκη 1 gr αγαρόζης (2%) σε 50 ml διαλύματος 1 x TAE που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιείται με βρασμό για 1,5 min σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 900 Watt. Στη συνέχεια το διάλυμα αγαρόζης αφήνεται μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ❖ Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται με προσοχή στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματιστεί το πήκτωμα
- ❖ Εφαρμόζεται κατάλληλη χτένα για το σχηματισμό οπών φόρτωσης

- ❖ Το πήκτωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί και μετά την πήξη του αφαιρείται η χτένα, στη συνέχεια βυθίζεται σε διάλυμα 1 x TAE
- ❖ Σε κάθε οπή τοποθετείται ποσότητα δείγματος που έχει αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής για την καταβύθισή του (0,5-1 μl χρωστικής και 3-5 μl δείγματος)
- ❖ Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η τάση στα 80-100 V για περίπου 40 min
- ❖ Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν.

#### 1.4 Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής

Η διαδικασία σύνθεσης cDNA από RNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) (εικόνα 4). Το ένζυμο που απομονώνεται από ορισμένους RNA ιούς, χρησιμοποιεί το RNA ως υπόστρωμα για να συνθέσει μια αλυσίδα DNA (copy DNA, cDNA). Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-RNA. Στη συνέχεια καταστρέφεται η αλυσίδα RNA και το γονίδιο-στόχος εντοπίζεται στη cDNA αλυσίδα και ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και με τη δράση της DNA πολυμεράσης.



**Εικόνα 4.** Περιγραφή της μεθόδου σύνθεσης του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την υβριδοποίηση των κατάλληλων εκκινητών, η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει συμπληρωματικό cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το mRNA. Επίσης, το RNA των RNA-cDNA υβριδίων υδρολύεται χωρίς να επηρεάζει το ελεύθερο RNA, οπότε στο τέλος της αντίδρασης υπάρχει μόνο μονόκλωνο cDNA.

Επομένως, με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT reaction) συντίθενται *in vitro* αλληλουχίες cDNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα μια αλυσίδα RNA. Το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής, cDNA, μπορεί να αποθηκευθεί για τον έλεγχο της έκφρασης πολλών γονιδίων εκφραζόμενων στο ίδιο δείγμα ιστού.

Στην παρούσα μελέτη για τη σύνθεση των πλήρους μήκους cDNAs πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση τυχαίων εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν τυποποιημένα αντιδραστήρια High Capacity RNA to cDNA Kit της εταιρείας Applied Biosystems (ABI).

Για την αντίδραση, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια (eppendorf) τα ακόλουθα:

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
Μήτρα (RNA):	1μg	x μl
Ρυθμιστικό διάλυμα*:	2X	10μl
Ένζυμο (Αντίστροφη Μεταγραφή)	20X	1μl
H <sub>2</sub> O ελεύθερο από RNase:	-	(20 - 10 - 1 - x) μl

\* Συμπεριλαμβάνει τυχαίους εκκινητές (εξαμερή) και dNTPs (dATP, dACP, dAGP, dAAP).

Ακολούθησε επώαση του μίγματος στους 37<sup>0</sup>C για 1 ώρα και στη συνέχεια έγινε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 95<sup>0</sup>C για 5 min. Το δείγμα χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση στη συσκευή της real-time PCR.

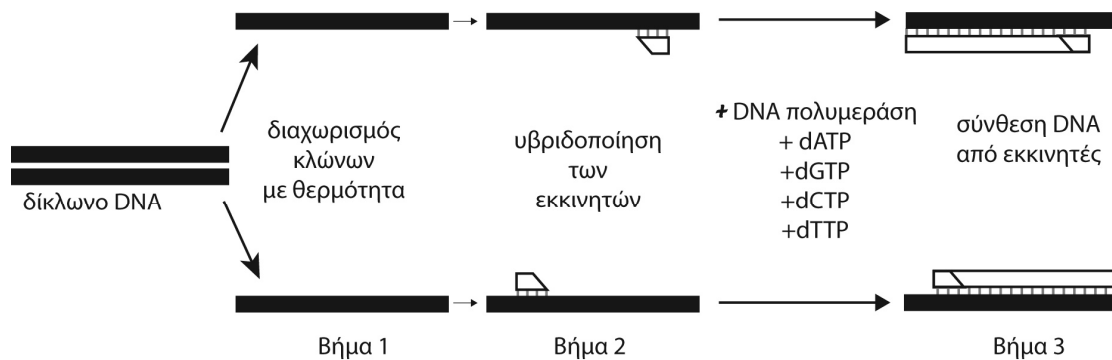
## 1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή 'μιμείται' το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της.

Με την τεχνική PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση *in vitro* ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κλώνων της αντίδρασης.

Το DNA στόχος που πρόκειται να ενισχυθεί, προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, κατάλληλους εκκινητές, δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και μαγνήσιο, και υπόκειται μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Το DNA στόχος είναι αυτό που θα αποτελέσει το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αφητηρία τους εκκινητές, δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια (εικόνα 5):

1. Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95°C, για 15 sec - 2 min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40-60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται με τους κλώνους του DNA στόχου.
3. Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 74°C.

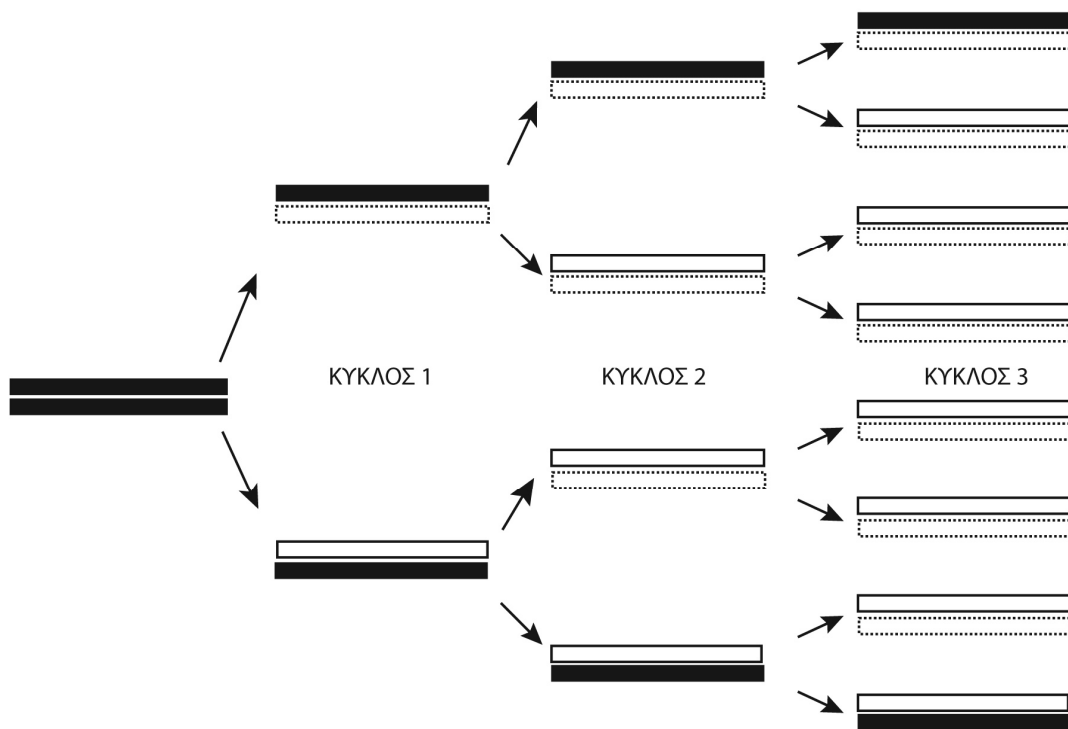


**Εικόνα 5:** Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο I: μετουσίωση δίκλωνου DNA. Στάδιο II: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο III: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA-πολυμεράσης.

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2<sup>ο</sup> κύκλο. Στο τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου οι κλώνοι θα είναι οκτώ και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός ανατύπων του στόχου DNA, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου, 2<sup>n</sup> φορές όπου n ο αριθμός των κύκλων (Εικόνα 6).





**Εικόνα 6.** Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1<sup>ου</sup> κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3<sup>ου</sup> κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής  $2^n$ , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

## 1.6 Συστατικά της PCR αντίδρασης

### ❶ Ταq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμοάντοχη Ταq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος.

### ❷ Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται, μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Η θερμοκρασία

υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά με βάση τα σημεία τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές.

#### ③ Ρυθμιστικά διαλύματα

Το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) και 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της Taq DNA πολυμεράσης. Απουσία των ελευθέρων ιόντων μαγνησίου, η DNA πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ σε περίσσεια αυτής η ακρίβεια του ενζύμου μειώνεται και είναι πιο πιθανή η πραγματοποίηση μη ειδικής ενίσχυσης. Η συγκέντρωση χηλικών παραγόντων, όπως είναι το EDTA, ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες, όπως είναι τα φωσφορικά ιόντα, πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα και αυτό γιατί χηλικοί ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες θα δημιουργούσαν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> με αρνητικά αποτελέσματα στη δράση της Taq DNA πολυμεράσης.

#### ④ dNTPs

Τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους ώστε να μη γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωσή τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-200 μM.

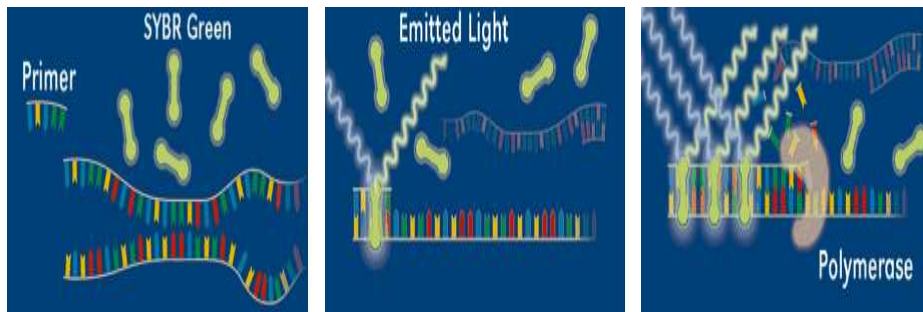
#### ⑤ Στόχος-Μήτρα DNA (template)

Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχειδειχθεί ότι είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται μεγάλα τμήματα DNA, αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Επιπλέον, θα πρέπει, το DNA να μην είναι αποδομημένο στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και ταυτόχρονα να είναι υψηλής καθαρότητας, απουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αντίδραση.

## 1.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

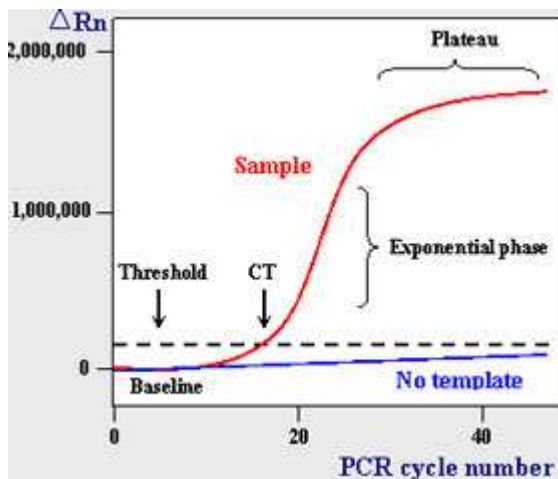
Η Real-Time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο) είναι μια *in vitro* μέθοδος ενζυμικού πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλουχιών RNA που επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας του RNA των αντίστοιχων γονιδίων στο δείγμα που εξετάζεται. Ανάλογα με την αρχική μήτρα που χρησιμοποιείται (RNA ή cDNA) μπορεί να διακριθεί σε ένα (cDNA ως αρχική μήτρα) ή δύο (RNA ως αρχική μήτρα) επιμέρους βήματα: 1) την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης και 2) τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του cDNA σε μια αντίδραση PCR.

Στην παρούσα εργασία το πειραματικό πρωτόκολλο της Real-Time PCR βασίστηκε στη χρήση και ανίχνευση κατάλληλης χρωστικής (SYBR Green). Η μεθοδολογία στη συγκεκριμένη περίπτωση στηρίζεται στη χρήση κατάλληλης φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green) που δεσμεύεται ειδικά στο δίκλωνο DNA και συνδυάζει ταυτόχρονα τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου επιτρέποντας την παρακολούθηση του προϊόντος της PCR αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (εικόνα 7). Η φθορίζουσα χρωστική μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (εικόνα 8). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από την κινητική των αντιδράσεών τους.



**Εικόνα 7.** Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).



**Εικόνα 8.** Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα

παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Η αναλυτική ικανότητα της Real Time-PCR στηρίζεται στο σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών και στη διαμόρφωση κατάλληλου θερμοκρασιακού πρωτοκόλλου ώστε να αποφεύγεται ο πολλαπλασιασμός μη ειδικών αλληλουχιών-στόχων (παραπροϊόντα). Πέρα όμως από αυτό, η ειδικότητά της πιστοποιείται από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος της PCR. Οι καμπύλες αποδιάταξης προκύπτουν από την παρακολούθηση της αλλαγής της έντασης του φθορισμού συναρτήσει της μεταβολής της θερμοκρασίας. Η μορφή τους εξαρτάται από το μέγεθος και την αλληλουχία του προϊόντος καθώς και από το περιεχόμενό του σε G-C. Οι θερμοκρασίες στις οποίες αποδιατάσσονται τα διαφορετικά προϊόντα της PCR παρουσιάζουν μεγάλο εύρος τιμών. Υπολογίζεται ότι ένα δίκλωνο μόριο με 0% GC περιεχόμενο αποδιατάσσεται 41<sup>0</sup>C χαμηλότερα από ότι ένα άλλο μόριο ίδιου μεγέθους με 100% GC περιεχόμενο. Έτσι, σε αντίθεση με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης, η ανάλυση των καμπυλών αποδιάταξης καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό προϊόντων ίδιου μήκους, με βάση την αναλογία βάσεων GC/AT. Για κάθε αντίδραση PCR, συμπεριλήφθηκε καμπύλη αποδιάταξης του προϊόντος.

Ο υπολογισμός της έκφρασης του κάθε γονιδίου στην αντίδραση της Real-Time PCR υπολογίστηκε από τον αριθμό των κύκλων στην εκθετική φάση της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός ανιχνεύθηκε πάνω από το επίπεδο Ct, μετά από την κανονικοποίησή του ως προς τον αντίστοιχο αριθμό των κύκλων για το δείγμα αναφοράς και ως προς την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης του γονιδίου αναφοράς της β-ακτίνης στο ίδιο δείγμα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος (μέθοδος ΔΔCt): Έκφραση =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

όπου:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ δείγματος} - \Delta C_T \text{ μάρτυρα} = (C_{T \text{ δείγματος}} - C_{T \text{ γονίδιο αναφοράς}}) - (C_{T \text{ μάρτυρα}} - C_{T \text{ γονίδιο αναφοράς}}).$$

Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^0 = 1$ , οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες

φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. (Livak & Schmittgen, 2001).

### ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Προκειμένου η παραπάνω εξίσωση να είναι ακριβής, είναι απαραίτητη η χρήση ενός κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου το οποίο πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις. Καταρχάς, το γονίδιο αυτό θα πρέπει να παρουσιάζει σταθερή και συνεχή έκφραση σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα και στο δείγμα αναφοράς. Επιπλέον, καλό είναι το ενδογενές γονίδιο να παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά του γονιδίου-στόχου. Ακόμη, δεν πρέπει να επηρεάζεται από τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες, καθώς θετική ή αρνητική ρύθμισή του οδηγεί σε λανθασμένη κανονικοποίηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τους λόγους που αναφέρονται, σε πειράματα που έχουν γίνει σε ορνίθια και αφορούν την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται η β ακτίνη.

Η β ακτίνη αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού σκελετού. Συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η αλλαγή του κυτταρικού σχήματος, η κυτταρική κινητικότητα, η κυτταρική διαίρεση, η φαγοκυττάρωση και η κατανομή στο κυτταρόπλασμα των διαλυτών πρωτεϊνών. Το mRNA της εκφράζεται σε ενδιάμεσα επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, γεγονός που συνέβαλε στην ευρεία χρήση του ως ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου στην ποσοτικοποίηση της Real-Time PCR.

Για την αντίδραση της Real-Time PCR τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια (eppendorf) τα ακόλουθα:

<b>Αντιδραστήρια</b>	Συγκέντρωση	Ποσότητα
Ρυθμιστικό δ/μα (SYBR Green PCR Master Mix)	2X	10
Πρόσθιος εκκινητής	10 μM	0,6
Οπίσθιος εκκινητής	10 μM	0,6
cDNA	80 ng	X
DNase free H <sub>2</sub> O:	-	20-(10+0.6+0.6+x) μl

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

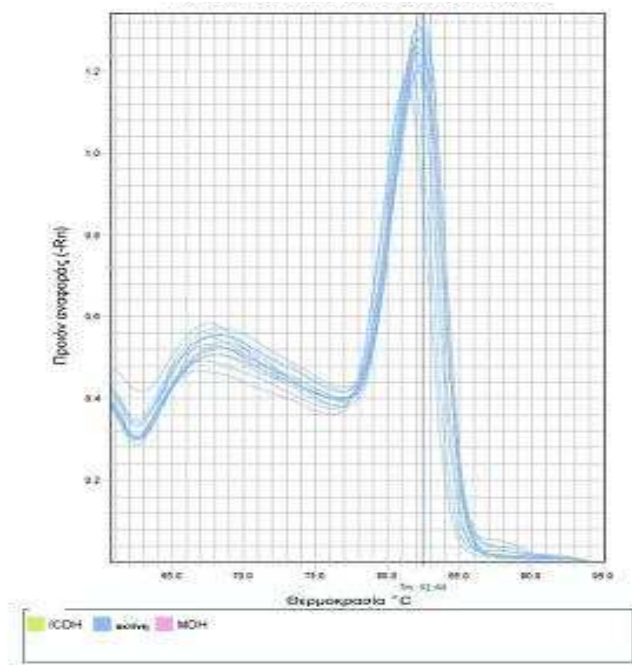
<u>Ακτίνη</u>
πρόσθιος: 5' - TGC GTG ACA TCA AGG AGA AG -3'
οπίσθιος: 5' - TGC CAG GGT ACA TTG TGG TA -3'
<u>Ισοκιτρική αφυδρογονάση</u>
πρόσθιος: 5' - CCC AGT TTG AAG CCC AAG AAG -3'
οπίσθιος: 5' - TCA ACA GTC TTG CCC ATC AGG -3'
<u>Μηλική αφυδρογονάση</u>
πρόσθιος: 5' - AGT GCC TAC CTG TGA TGT TG -3'
οπίσθιος: 5' - GGC TTG ACC TCT GAT TCT CT -3'

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν το εξής:

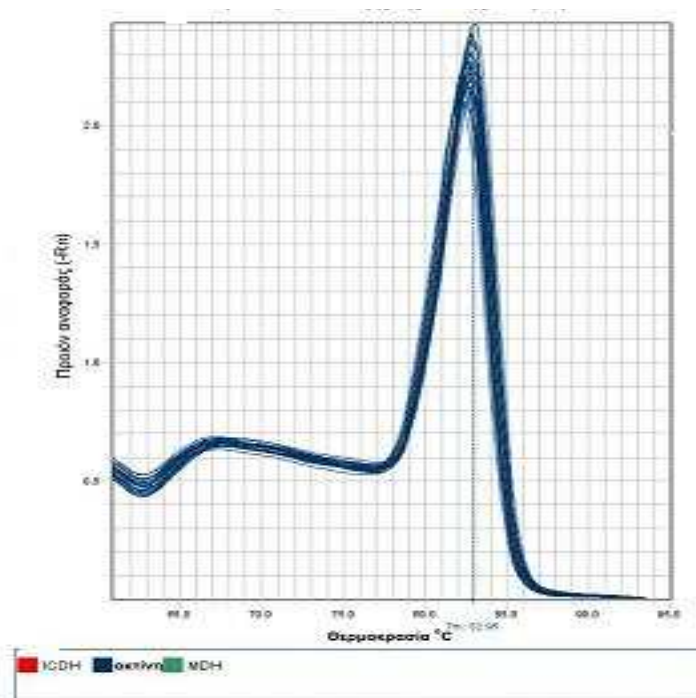
- 95<sup>0</sup>C για 10 min
- 40 κύκλοι
  - 95<sup>0</sup>C για 15 sec
  - 60<sup>0</sup>C για 1 min.

Οι αντίστοιχες καμπύλες αποδιάταξης Tm που προέκυψαν για τα τρία γονίδια είναι:

### Καμπύλη αποδιάταξης της ακτίνης στον λιπώδη ιστό

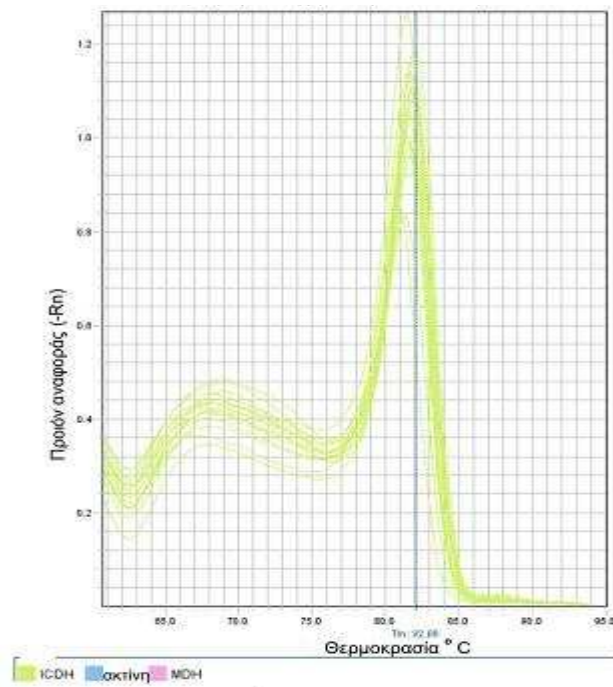


### Καμπύλη αποδιάταξης της ακτίνης στο ήπαρ

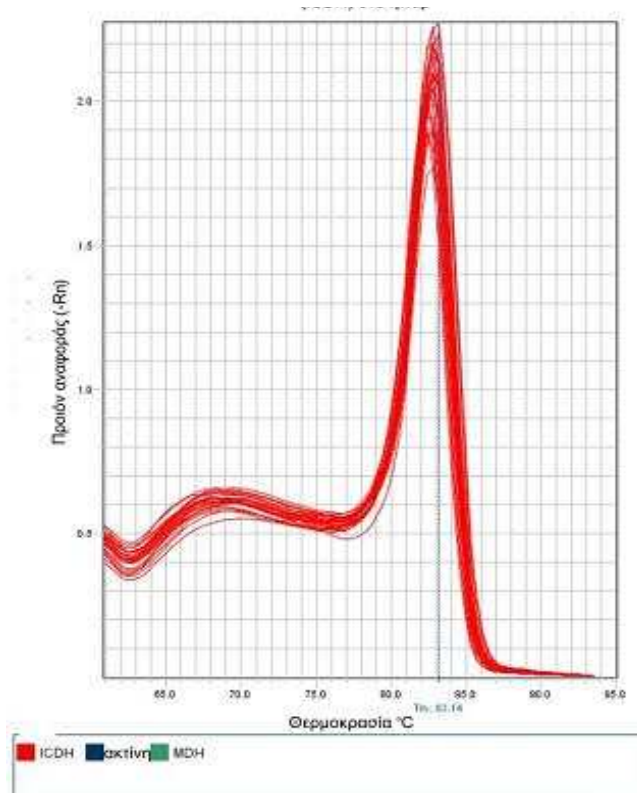




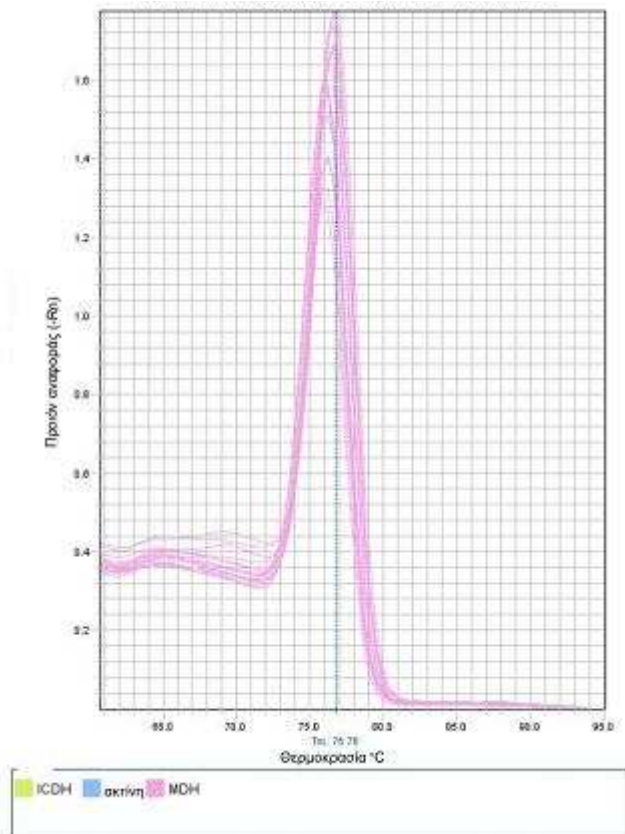
Καμπύλη αποδιάταξης της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH) στο λιπώδη ιστό



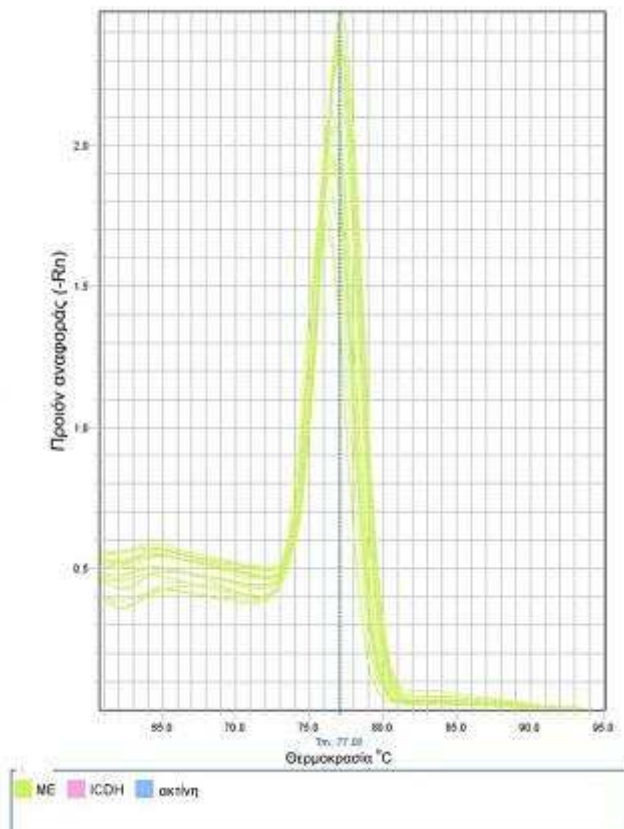
Καμπύλη αποδιάταξης της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH) στο ήπαρ



Καμπύλη αποδιάταξης του μηλικού ενζύμου (ME) στο λιπώδη ιστό



Καμπύλη αποδιάταξης του μηλικού ενζύμου (ME) στο ήπαρ



## 1.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Μετά τη διεξαγωγή του πειράματος έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων διεξήχθη με εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) με την βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS 16.0., και εξετάστηκε η επίδραση του ευνουχισμού και της ηλικίας σφαγής στην έκφραση των γονιδίων λιπογένεσης σε ορνίθια ωοπααραγωγικού τύπου. Η ανάλυση διασποράς είναι μία διαδεδομένη μέθοδος σύγκρισης των μέσων δύο ή περισσότερων πληθυσμών διότι επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο όλων των μέσων.

## 1.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την στατιστική επεξεργασία προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν:

### 1.9.1 Επίδραση του ευνουχισμού στην γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων

Πίνακας 1: Εκτιμήσεις διάφορων στατιστικών μέτρων της γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων της ισοκιτρικής (ICDH) και μηλικής (MDH) αφυδρογονάσης στο λιπώδη ιστό με βάση την επέμβαση του ευνουχισμού.

		Μέγεθος δείγματος	Μέση Τιμή	Τοπική Απόκλιση	Τοπικό Σφάλμα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή		Ελάχιστο	Μέγιστο
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο		
ICDH	1	27	7,19	4,26	0,82	5,51	8,88	1,94	20,58
	2	28	5,38	4,31	0,82	3,71	7,05	1,00	24,30
MDH	1	27	0,22	0,20	0,04	0,14	0,30	0,08	1,09
	2	28	0,31	0,25	0,05	0,21	0,40	0,09	1,01

Όπου 1= ομάδα ελέγχου (μάρτυρας) και 2= ομάδα επέμβασης (ευνουχισμός).

Στον πίνακα 1, παρουσιάζονται οι εκτιμήσεις των διάφορων στατιστικών μέτρων της γονιδιακής έκφρασης των δύο ενζύμων στο λιπώδη ιστό. Παρατηρούμε ότι η επέμβαση του ευνουχισμού είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης τιμής της

ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (από  $7,19 \pm 0,82$  σε  $5,38 \pm 0,82$  ) ενώ ταυτόχρονα οδήγησε σε αύξηση της μέσης τιμής της μηλικής αφυδρογονάσης (από  $0,22 \pm 0,04$  σε  $0,31 \pm 0,05$  ).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (ευνουχισμός) στο λιπώδη ιστό.

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντι- κότητα (P-value)
ICDH	Μεταξύ των ομάδων	45,052	1	45,052	2,448	0,124
	Εντός των ομάδων	975,423	53	18,404		
MDH	Μεταξύ των ομάδων	0,103	1	0,103	2,062	0,157
	Εντός των ομάδων	2,653	53	0,050		

Όμως οι παραπάνω διαφορές με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς στον πίνακα 2 δείχνουν ότι η επίδραση του ευνουχισμού δεν προκαλεί σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση των δύο αφυδρογονασών στο λιπώδη ιστό. Πιο αναλυτικά για την ισοκιτρική βρέθηκε  $P=0,124$  και για τη μηλική  $P=0,157$ .

Πίνακας 3: Εκτιμήσεις διάφορων στατιστικών μέτρων της γονιδιακής έκφρασης των δύο ενζύμων στο ήπαρ με βάση την επέμβαση του ευνουχισμού.

		Μέγεθος δείγματος	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Τυπικό Σφάλμα	95% Διάστημα		Ελάχιστο	Μέγιστο
						Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή			
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο		
ICDH	1	25	2,10	1,26	0,25	1,58	2,62	0,11	5,02
	2	27	1,94	1,43	0,28	1,37	2,50	0,05	6,49
MDH	1	25	0,21	0,25	0,05	0,10	0,31	0,01	1,00
	2	27	0,34	0,28	0,05	0,23	0,45	0,02	1,12

Στον πίνακα 3, παρουσιάζονται οι τιμές της γονιδιακής έκφρασης και διάφορα στατιστικά μέτρα τους όπως εκτιμήθηκαν στο ήπαρ. Παρατηρούμε ότι η επέμβαση του ευνουχισμού οδήγησε σε μείωση της μέση τιμής της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (από  $2,10 \pm 0,25$  στην ομάδα του μάρτυρα σε  $1,94 \pm 0,28$  στην ομάδα των ευνουχισμένων) ενώ η μέση τιμή της μηλικής αφυδρογονάσης αυξήθηκε (από  $0,21 \pm 0,05$  στην ομάδα του μάρτυρα σε  $0,34 \pm 0,05$  στα ευνουχισμένα ορνίθια).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα της ανάλυσης της διασποράς κατά ένα παράγοντα (ευνουχισμός) στο ήπαρ.

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντικότητα (P-value)
ICDH	Μεταξύ των ομάδων	0,346	1	0,346	0,188	0,667
	Εντός των ομάδων	92,012	50	1,840		
MDH	Μεταξύ των ομάδων	0,220	1	0,220	3,156	0,082
	Εντός των ομάδων	3,493	50	0,070		

Με βάση τα αποτελέσματα από την ανάλυση διασποράς στον πίνακα 4, γίνεται σαφές ότι στο ήπαρ η επέμβαση του ευνουχισμού προκαλεί διαφοροποίηση στην γονιδιακή έκφραση της μηλικής αφυδρογονάσης που είναι οριακά σημαντική ( $P \leq 0,08$ ) ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές της ισοκιτρικής.

### 1.9.2 Επίδραση της ηλικίας σφαγής στη γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων στους δύο ιστούς

Πίνακας 5: Εκτιμήσεις διάφορων στατιστικών μέτρων της γονιδιακής έκφρασης των δύο ενζύμων στο λιπώδη ιστό με βάση την ηλικία σφαγής.

		Μέγεθος δείγματος	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Τυπικό Σφάλμα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή		Ελάχιστο	Μέγιστο
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο		
ICDH	1	19	5,70	2,82	0,65	4,34	7,06	1,00	12,8
	2	18	6,16	5,12	1,20	3,62	8,71	2,31	24,3
	3	18	6,98	4,94	1,16	4,52	9,44	1,74	20,5
MDH	1	19	0,23	0,18	0,04	0,14	0,33	0,10	1,00
	2	18	0,23	0,29	0,04	0,14	0,32	0,08	0,80
	3	18	0,33	0,23	0,07	0,19	0,48	0,09	1,09

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα στατιστικά μέτρα της γονιδιακής έκφρασης της ισοκιτρικής και μηλικής αφυδρογονάσης στο λιπώδη ιστό με βάση την ηλικία σφαγής. Στην ηλικία σφαγής των 26 εβδομάδων (1η ηλικία σφαγής) η μέση τιμή της γονιδιακής έκφρασης της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ήταν  $5,70 \pm 2,82$ . Στην ηλικία σφαγής των 30 εβδομάδων (2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής) και των 34 εβδομάδων (3<sup>η</sup> ηλικία σφαγής) οι μέσες τιμές ήταν  $6,16 \pm 5,12$  και  $6,98 \pm 4,94$ , αντίστοιχα. Παρατηρείται μία αύξηση της γονιδιακής έκφρασης από την πρώτη έως την τρίτη ηλικία σφαγής. Οι μέσες τιμές της γονιδιακής έκφρασης της μηλικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ηλικία σφαγής ήταν  $0,23 \pm 0,18$ ,  $0,23 \pm 0,29$  και  $0,33 \pm 0,23$  αντίστοιχα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (ηλικία σφαγής) στο λιπώδη ιστό.

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντι- κότητα (P-value)
ICDH	Μεταξύ των ομάδων	15,611	2	7,805	0,404	0,670
	Εντός των ομάδων	1004,864	52	19,324		
MDH	Μεταξύ των ομάδων	0,124	2	0,062	1,227	0,302
	Εντός των ομάδων	2,632	52	0,051		

Με βάση την ανάλυση διασποράς στον πίνακα 6 φαίνεται ότι στο λιπώδη ιστό ο παράγοντας ‘ηλικία σφαγής’ δεν επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων ( $P > 0,05$ ).

Πίνακας 7: Εκτιμήσεις διάφορων στατιστικών μέτρων της γονιδιακής έκφρασης των δύο ενζύμων στο ήπαρ με βάση την ηλικία σφαγής.

		Μέγεθος δείγματος	Μέση Τιμή	Τοπική Απόκλιση	Τοπικό Σφάλμα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή		Ελάχιστο	Μέγιστο
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο		
ICDH	1	17	1,52	1,24	0,30	0,88	2,16	0,05	4,07
	2	18	2,52	1,52	0,36	1,76	3,28	0,93	6,49
	3	17	1,97	1,09	0,26	1,41	2,53	0,40	5,02
MDH	1	17	0,30	0,35	0,08	0,12	0,48	0,01	1,12
	2	18	0,24	0,21	0,05	0,13	0,35	0,08	0,81
	3	17	0,28	0,24	0,06	0,16	0,42	0,04	0,93

Όπου 1, 2 και 3 οι τρεις ηλικίες σφαγής.

Στον πίνακα 7 σημειώνονται οι μέσες τιμές της γονιδιακής έκφρασης των δύο αφυδρογονασών στο ήπαρ με βάση την ηλικία σφαγής. Στην ηλικία σφαγής των 26

εβδομάδων (1η ηλικία σφαγής) η μέση τιμή της γονιδιακής έκφρασης της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ήταν  $1,52 \pm 0,30$ . Στην ηλικία σφαγής των 30 εβδομάδων (2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής) και των 34 εβδομάδων (3<sup>η</sup> ηλικία σφαγής) οι μέσες τιμές ήταν  $2,52 \pm 0,36$  και  $1,97 \pm 0,26$ , αντίστοιχα. Οι μέσες τιμές της γονιδιακής έκφρασης της μηλικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ηλικία σφαγής ήταν  $0,30 \pm 0,08$ ,  $0,24 \pm 0,05$  και  $0,28 \pm 0,06$  αντίστοιχα.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα της ανάλυσης της διασποράς κατά ένα παράγοντα (ηλικία σφαγής) στο ήπαρ.

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντι- κότητα (P-value)
ICDH	Μεταξύ των ομάδων	8,869	2	4,435	2,603	0,084
	Εντός των ομάδων	83,488	49	1,704		
MDH	Μεταξύ των ομάδων	0,039	2	0,020	0,261	0,771
	Εντός των ομάδων	3,674	49	0,075		

Με βάση τον πίνακα 8 βρέθηκε ότι ο παράγοντας 'ηλικία σφαγής' προκάλεσε διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής στο ήπαρ σε οριακό επίπεδο, ( $P \leq 0,084$ ) ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση ( $P = 0,771$ ) στις τιμές της μηλικής αφυδρογονάσης ανάμεσα στις τρεις ηλικίες σφαγής.



Πίνακας 9: Πολλαπλές συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ηλικίες σφαγής στο λιπώδη ιστό.

Εξαρτημένη Μεταβλητή	Ηλικία σφαγής		Διαφορά Μέσης Τιμής	Τυπικό Σφάλμα	Σημαντικότητα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή	
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο
ICDH	1	2	0,47	1,44	0,748	3,36	2,43
		3	1,28	1,44	0,378	4,18	1,61
	2	1	0,47	1,44	0,748	2,43	3,36
		3	0,82	1,46	0,578	3,76	2,11
	3	1	1,28	1,44	0,378	1,61	4,18
		2	0,82	1,46	0,578	2,11	3,76
MDH	1	2	0,02	0,07	0,974	0,15	0,15
		3	0,10	0,07	0,182	0,25	0,05
	2	1	0,02	0,07	0,974	0,15	0,15
		3	0,10	0,07	0,178	0,25	0,05
	3	1	0,10	0,07	0,182	0,05	0,25
		2	0,10	0,07	0,178	0,05	0,25

Στον πίνακα 9 τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ‘ηλικία σφαγής’ δεν επηρεάζει την έκφραση των δύο γονιδίων λιπογένεσης, της ισοκιτρικής και μηλικής αφυδρογονάσης ( $P\text{-value}>0,05$ ) στο λιπώδη ιστό. Αντίθετα, στο ήπαρ υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης της ισοκιτρικής από την πρώτη στη δεύτερη ηλικία σφαγής ( $P<0,027$ ), ενώ δε βρέθηκε κάτι ανάλογο από τη 2<sup>η</sup> στην 3<sup>η</sup> ηλικία σφαγής ( $P=0,220$ ) καθώς και από την 1<sup>η</sup> στην 3<sup>η</sup> ( $P=0,313$ ) (πίνακας 10).

Πίνακας 10: Πολλαπλές συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ηλικίες σφαγής στο ήπαρ.

Εξαρτημένη Μεταβλητή	Ηλικία σφαγής		Διαφορά Μέσης Τιμής	Τυπικό Σφάλμα	Σημαντικότητα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή	
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο
ICDH	1	2	1,00	0,44	0,027	1,89	0,18
		3	0,46	0,45	0,313	1,35	0,44
	2	1	1,00	0,44	0,027	0,12	1,89
		3	0,55	0,44	0,220	0,34	1,43
	3	1	0,46	0,45	0,313	0,44	1,35
		2	0,55	0,44	0,220	1,43	0,34
MDH	1	2	0,06	0,09	0,487	0,12	0,25
		3	0,02	0,09	0,842	0,17	0,21
	2	1	0,06	0,09	0,487	0,25	0,12
		3	0,05	0,09	0,621	0,23	0,14
	3	1	0,02	0,09	0,842	0,21	0,17
		2	0,05	0,09	0,621	0,14	0,23

Πίνακας 11: Αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς ως προς την ηλικία σφαγής στους δύο ιστούς στην ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων.

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντι- κότητα (P-value)
ICDH Λιπώδης ιστός	Μεταξύ των ομάδων	12,650	2	6,325	0,323	0,727
	Εντός των ομάδων	489,794	25	19,592		
MDH λιπώδης ιστός	Μεταξύ των ομάδων	0,061	2	,031	0,487	0,620
	Εντός των ομάδων	1,573	25	,063		
ICDH ήπαρ	Μεταξύ των ομάδων	18,586	2	9,293	6,341	0,006
	Εντός των ομάδων	35,175	24	1,466		
MDH ήπαρ	Μεταξύ των ομάδων	0,112	2	0,056	0,709	0,502
	Εντός των ομάδων	1,889	24	0,079		

Η ίδια σημαντική επίδραση της ηλικίας σφαγής στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής ( $P < 0,006$ ) βρέθηκε και όταν η ανάλυση διασποράς πραγματοποιήθηκε μόνο λαμβάνοντας υπόψη την ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων (πίνακας 11). Αντίθετα, μέσα στην ομάδα του μάρτυρα (μη ευνουχισμένα) η ανάλυση της διασποράς δεν ανέδειξε καμία σημαντική επίδραση (πίνακας 12).

Πίνακας 12: Αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς ως προς τον παράγοντα ηλικία σφαγής στην ομάδα του μάρτυρα (μη ευνουχισμένα).

		Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσα Τετράγωνα	F	Σημαντι- κότητα (P-value)
ICDH Λιπώδης ιστός	Μεταξύ των ομάδων	70,758	2	35,379	2,111	0,143
	Εντός των ομάδων	402,221	24	16,759		
MDH λιπώδης ιστός	Μεταξύ των ομάδων	0,074	2	0,037	0,946	0,402
	Εντός των ομάδων	0,944	24	0,039		
ICDH ήπαρ	Μεταξύ των ομάδων	2,882	2	1,441	0,896	0,422
	Εντός των ομάδων	35,368	22	1,608		
MDH ήπαρ	Μεταξύ των ομάδων	0,003	2	0,001	0,020	0,980
	Εντός των ομάδων	1,490	22	0,068		

Στην ίδια κατεύθυνση είναι τα αποτελέσματα από τη μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων εντός της ομάδας των ευνουχισμένων ορνιθίων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 13 η σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής στο ήπαρ βρέθηκε από την 1<sup>η</sup> στη 2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής και επιπλέον από τη 2<sup>η</sup> στην 3<sup>η</sup>

Πίνακας 13 : Πολλαπλές συγκρίσεις ανάμεσα στις τρεις ηλικίες σφαγής στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό.

Εξαρτημένη Μεταβλητή	Ηλικία σφαγής		Διαφορά Μέσης Τιμής	Τυπικό Σφάλμα	Σημαντικότητα	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης για τη Μέση Τιμή	
						Χαμηλότερο Όριο	Υψηλότερο Όριο
ICDH Λιπώδης ιστός	1	2	-1,32	2,08	1,000	-6,67	4,03
		3	0,20	2,03	1,000	-5,01	5,41
	2	1	1,32	2,08	1,000	-4,03	6,67
		3	1,52	2,03	1,000	-3,69	6,74
	3	1	-0,20	2,03	1,000	-5,41	5,01
		2	-1,52	2,03	1,000	-6,74	3,69
MDH λιπώδης ιστός	1	2	0,05	0,11	1,000	-0,24	0,36
		3	-0,05	0,11	1,000	-0,35	0,23
	2	1	-0,05	0,11	1,000	-0,36	0,24
		3	-0,11	0,11	1,000	-0,40	0,18
	3	1	0,05	0,11	1,000	-0,23	0,35
		2	0,11	0,11	1,000	-0,18	0,40
ICDH ήπαρ	1	2	-1,92(*)	0,58	0,010	-3,43	-0,41
		3	-0,34	0,57	1,000	-1,81	1,13
	2	1	1,92(*)	0,58	0,010	0,41	3,43
		3	1,58(*)	0,55	0,027	0,15	3,01
	3	1	0,34	0,57	1,000	-1,13	1,81
		2	-1,58(*)	0,55	0,027	-3,01	-0,15
MDH ήπαρ	1	2	0,16	0,13	0,740	-0,18	0,51
		3	0,09	0,13	1,000	-0,24	0,43
	2	1	-0,16	0,13	0,740	-0,51	0,18
		3	-0,06	0,12	1,000	-0,39	0,26
	3	1	-0,09	0,13	1,000	-0,43	0,24
		2	0,06	0,12	1,000	-0,26	0,39

### 1.9.3 Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των δύο αφυδρογονασών στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ.

Πίνακας 14: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο ενζύμων

Μεταβλητές		ICDH λιπώδης ιστός	MDH λιπώδης ιστός	ICDH ήπαρ	MDH ήπαρ	Επέμβαση	Ηλικία σφαγής
ICDH - λιπώδης ιστός	Συσχέτιση	1,000	0,398	0,160	-0,067	0,105	-0,177
	P-value	.	0,003	0,258	0,639	0,458	0,208
	B.E	0	50	50	50	50	50
MDH - λιπώδης ιστός	Συσχέτιση		1,000	-0,120	0,008	0,210	0,171
	P-value		.	0,397	0,957	0,134	0,225
	B.E		0	50	50	50	50
ICDH - ήπαρ	Συσχέτιση			1,000	0,169	0,138	-0,061
	P-value			.	0,230	0,328	0,667
	B.E			0	50	50	50
MDH - ήπαρ	Συσχέτιση				1,000	-0,028	0,244
	P-value				.	0,841	0,082
	B.E				0	50	50
Επέμβαση ευνουχι- σμού	Συσχέτιση					1,000	0,095
	P-value					.	0,502
	B.E					0	50
Ηλικία σφαγής	Συσχέτιση						1,000
	P-value						.
	B.E						0
Επέμβαση ευνουχισμού & ηλικία σφαγής	ICDH - λιπώδης ιστός	Συσχέτιση	1,000	0,429	0,136	-0,018	
		P-value	.	0,002	0,346	0,901	
		B.E	0	48	48	48	
	MDH - λιπώδης ιστός	Συσχέτιση		1,000	-0,144	-0,026	
		P-value		.	0,317	0,860	
		B.E		0	48	48	
	ICDH - ήπαρ	Συσχέτιση			1,000	0,200	
		P-value			.	0,163	
		B.E			0	48	
	MDH - ήπαρ	Συσχέτιση				1,000	
		P-value				.	
		B.E				0	

B.E.: Βαθμοί Ελευθερίας

P-value: Σημαντικότητα

Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η πιθανή συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των δύο αφυδρογονασών στους δύο ιστούς. Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Η εύρεση μιας ισχυρής συσχέτισης θα μείωνε το κόστος προσδιορισμού των δύο αφυδρογονασών διότι θα επέτρεπε την έμμεση εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης της μιας με βάση τη μέτρηση της άλλης. Η συσχέτιση που βρέθηκε είναι σημαντική ( $F=0,398$ ) όμως δεν είναι τόσο ισχυρή και δεν επιτρέπει να στηριχτεί κανείς σε αυτήν.

## 2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι οικονομικές διαστάσεις που λαμβάνει ο μεταβολισμός και ειδικότερα ο βαθμός εναπόθεσης του λιπώδους ιστού, στη ζωική παραγωγή, σε συνδυασμό με το έντονο ενδιαφέρον του καταναλωτικού κοινού σε θέματα που αφορούν τη παχυσαρκία, αλλά και την κατανάλωση ζωικών προϊόντων με περιορισμένη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα, δημιούργησαν την ανάγκη μελέτης και κατανόησης του ρυθμού λιπογένεσης και λιπόλυσης.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία σημαντική αύξηση στη διερεύνηση καλύτερης ποιότητας κρέατος πουλερικών, γεγονός που οδήγησε στην επανεκτίμηση της χρήσης τοπικών φυλών πτηνών και παραδοσιακών τεχνικών όπως ο ευνουχισμός. Η παραγωγή ευνουχισμένων ορνιθίων (καπόνια) σε ορισμένες χώρες όπως η Γαλλία έχει μακρά παράδοση, και τα καπόνια προτιμώνται από τους καταναλωτές επειδή το κρέας τους είναι πολύ τρυφερό (Mast et al., 1981 · Welter 1976). Ωστόσο η κύρια επίπτωση του ευνουχισμού είναι ότι οδηγεί σε αύξηση της συνολικής εναπόθεσης λίπους του σφάγιου, χαρακτηριστικό με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον, διότι η αυξημένη παραγωγή λίπους μειώνει την οικονομική του αξία.

Στα πτηνά η λιπογένεση λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ (Leveille et al., 1975) και περιλαμβάνει μία σειρά από αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από ένζυμα. Δυο σημαντικά ένζυμα που εμπλέκονται στη λιπογένεση των πτηνών είναι η NADP-αφυδρογονάση του μηλικού (NADP-ICDH) και η NADP-αφυδρογονάση του ισοκιτρικού (NADP-ICDH) οξέος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικεύουν τα δύο παραπάνω ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της λιπογένεσης στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ αρσενικών και ευνουχισμένων ορνιθίων ωσπαραγωγής.

Ο ευνουχισμός λόγω της συνακόλουθης μείωσης των ανδρογόνων οδηγεί σε αύξηση: 1) του κοιλιακού λίπους (Fennell et al., 1990 · Fennell & Scanes, 1992 · Chen et al., 2006a) και

2) της συνολικής περιεκτικότητας του ήπατος σε λιπίδια και κατ' επέκταση στη συσσώρευση των λιπιδίων μεταξύ της υποδερμίδας και των μυών (Chen et al., 2006a).

Η αύξηση αυτή εξαρτάται τόσο από τη φυλή του πτηνού όσο και από την ηλικία όπου πραγματοποιήθηκε η επέμβαση του ευνουχισμού καθώς και από την ηλικία σφαγής του (Tor et al., 2002). Οι Lin & Hsu (2002) και Chen et al. (2007) υποστηρίζουν ότι ο ευνουχισμός ενισχύει την ανάπτυξη των πτηνών. Άλλες όμως μελέτες καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα, προτείνοντας ότι υπάρχει αρνητική επίδραση του ευνουχισμού στην ανάπτυξή τους ( Fennell & Scanes 1992). Οι αποκλίσεις αυτές οφείλονται στις διαφορετικές φυλές, ηλικίες σφαγής, ηλικίες επέμβασης και συνθήκες διαχείρισης των πτηνών.

Τα ανδρογόνα εκτός του ότι είναι υπεύθυνα για τη σεξουαλική συμπεριφορά, παίζουν και σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πτηνών (Decuyperre & Buysse, 2005). Στα θηλαστικά ενεργοποιούν την πρωτεϊνική σύνθεση και οδηγούν στην αύξηση της μυϊκής μάζας βελτιώνοντας την κατακράτηση αζώτου, φωσφόρου και καλίου στο σώμα (Ford & Klindt, 1989). Η πιο ισχυρή ανδρογόνος ορμόνη είναι η τεστοστερόνη η οποία συσχετίζεται αρνητικά με την εναπόθεση λίπους. Έχει επίσης αναφερθεί, ότι η μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης καταστέλλει τη δράση της λιπάσης και ενζύμων που συμμετέχουν στο κύκλο του Krebs' ενώ οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και της τριακυλογλυκερόλης (Xu et al., 2002). Η τριακυλογλυκερόλη αποτελεί πηγή ενέργειας για όλα τα ζώα (Sturkie, 1976). Η χοληστερόλη είναι γνωστό ότι είναι μία λιπαρή ουσία, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των λιποπρωτεϊνικών συμπλόκων που σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Οι λιποπρωτεΐνες μεταφέρουν τη χοληστερόλη στην κυκλοφορία του αίματος (Russel, 1992). Ο ευνουχισμός αυξάνει τη συγκέντρωση της τριακυλογλυκερόλης καθώς και της χοληστερόλης (Chen et al., 2005, 2006a)

Στη βιομηχανία κρέατος πουλερικών, η επέμβαση του ευνουχισμού συνήθως πραγματοποιείται σε πτηνά νεαρής ηλικίας, πριν την ολοκλήρωση της σεξουαλικής τους ωριμότητας. Η επίδραση των γονάδων στην ανάπτυξη ξεκινάει πολύ νωρίς (Raham et al., 1984) αλλά αρχίζουν να εκφράζονται πλήρως μετά την ήβη. Τα καπόνια τα οποία ευνουχίζονται μετά την ολοκλήρωση της σεξουαλικής τους



ωριμότητας αναπτύσσονται με βραδύτερους ρυθμούς συγκριτικά με τα μη ευνουχισμένα ορνίθια. Οι στερεοειδείς ορμόνες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη των πτηνών που βρίσκονται στην ήβη και ως αναβολικοί παράγοντες, αυξάνουν την αποτελεσματικότητα χρήσης του αζώτου (Lawrence & Fowler, 2002).

Σύμφωνα με τους Chen et al., (2006a) η μειωμένη παραγωγή ανδρογόνων έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της επιθετικότητας των ορνιθίων και η ενέργεια που αποταμιεύεται μπορεί να επιφέρει βελτίωση της ποιότητας του κρέατος των καπονιών. Το κρέας που προέρχεται από τα καπόνια είναι πιο τρυφερό, γευστικότερο και πιο χυμώδες από αυτό των μη ευνουχισμένων ορνιθίων. Με την επέμβαση του ευνουχισμού γίνεται δυνατή η διοχέτευση στην αγορά ενός ειδικού τύπου κρέατος που προέρχεται από τα πουλερικά. (Miguel et al., 2008 · Lin & Hsu, 2002). Όσο σε πιο μικρή ηλικία πραγματοποιείται η επέμβαση του ευνουχισμού τόσο πιο τρυφερό είναι το κρέας (Chen et al., 2005, 2006).

Στην παρούσα εργασία, η επέμβαση του ευνουχισμού δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την έκφραση των δύο γονιδίων στο λιπώδη ιστό ( $P > 0,05$ ). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την υπόθεση του Goodridge (1968) και των O'Hea et al., (1968), ότι ο λιπώδης ιστός στα πτηνά αποτελεί περισσότερο όργανο αποθήκευσης λιπαρών οξέων παρά καθ' αυτό όργανο λιπογένεσης. Στο ήπαρ η επέμβαση του ευνουχισμού εμφανίζεται να είναι οριακά σημαντική για την γονιδιακή έκφραση της μηλικής αφυδρογονάσης ( $P < 0,08$ ). Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των εργασιών του Chen et al., (2005, 2006a, 2007) όπου στα ευνουχισμένα ορνίθια παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της μηλικής αφυδρογονάσης η οποία με τη δράση της οδηγεί και στην αύξηση του κοιλιακού λίπους. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ο Goodridge (1968) αναφέρει ότι η δράση του μηλικού ενζύμου συσχετίζεται θετικά με την αυξημένη ηπατική λιπογένεση στα πτηνά. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν ο Richards et al. (2003) και οι Haugh et al. (1985).

Από τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού-πυροσταφυλικού, η μηλική αφυδρογονάση προσφέρει το μεγαλύτερο ποσό NADPH που απαιτείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού συμμετέχει σε πολύ μικρότερο βαθμό (Goodridge, 1968b · Shapira et al., 1978). Τα ένζυμα του κύκλου των φωσφοροπεντοζών σύμφωνα με τις εργασίες των Hood et al., (1982), Shapira et al., (1978), Tanaka et al., (1983) και Kouba et al., (1992) έχουν χαμηλή ενζυμική ενεργότητα τόσο στο λιπώδη ιστό όσο και στο ήπαρ των πτηνών. Οι

χαμηλές τιμές της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορογλυκόζης και της αφυδρογονάσης του 6-φωσφορογλυκονικού, αποδεικνύουν την μικρή συνεισφορά των ενζύμων του κύκλου των φωσφοροπεντοζών στην παραγωγή της απαραίτητης, για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, ποσότητας NADPH (Shapira et al., 1978). Σε συμφωνία είναι και τα αποτελέσματα των Tanaka et al., (1983) βρήκαν ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων και της ενεργότητας των ενζύμων του κύκλου των φωσφοροπεντοζών στο ήπαρ των ορνιθίων, με εξαίρεση την αφυδρογονάση του μηλικού, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

Η εναπόθεση χημικού λίπους αυξάνεται προϋούσης της ηλικίας, (Leenstra, 1986) ένα φαινόμενο που αντικατοπτρίζεται στο ποσοστό του χημικού λίπους και στον όγκο των λιποκυττάρων και στις δύο πειραματικές ομάδες, μέχρι την 30<sup>η</sup> εβδομάδα. Έχει παρατηρηθεί ότι το φαινόμενο αυτό διαφοροποιείται την 34<sup>η</sup> εβδομάδα στην ομάδα του μάρτυρα, καθώς το ποσοστό του χημικού λίπους όσο και ο όγκος των λιποκυττάρων μειώθηκαν (Συμεών, 2009). Η μείωση αυτή οφείλεται στην αύξηση της δραστηριότητας και της επιθετικότητας των ορνιθίων της ομάδας του μάρτυρα. Αντίθετα, στην ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων, τα οποία παρουσιάζουν πιο ήρεμο χαρακτήρα, αντίστοιχο με το χαρακτήρα των θηλυκών ορνιθίων, τέτοια μείωση δεν παρατηρήθηκε.

Ο αριθμός των λιποκυττάρων παρουσιάζει μία αυξητική τάση στα ευνουχισμένα ορνίθια εξαιτίας της συνεχιζόμενης εναπόθεσης λίπους (Συμεών, 2009). Έχει βρεθεί, επίσης, ότι στους επίμυες, (Bjorntorp, 1982), τα βοοειδή (Hood & Allen, 1973), τα πρόβατα (Rogdakis et al., 1997) και τον άνθρωπο (Bjorntorp, 1974) όταν η εναπόθεση λίπους είναι αυξημένη και τα λιποκύτταρα αποκτήσουν ένα μέγιστο μέγεθος, τότε νέα λιποκύτταρα παράγονται από τους λιποβλάστες. Στα πτηνά πιστεύεται ότι η αύξηση του λιπώδους ιστού με υπερπλασία διαρκεί περίπου μέχρι την 12<sup>η</sup>-14<sup>η</sup> εβδομάδα ενώ μετά την 15<sup>η</sup> η αύξηση περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην υπερτροφία των λιποκυττάρων (Cartwright et al., 1988).

Στην παρούσα μελέτη στο λιπώδη ιστό η ηλικία σφαγής δεν επηρέασε την γονιδιακή έκφραση των δύο ενζύμων ενώ στο ήπαρ παρουσιάστηκε μία τάση διαφοροποίησης στην έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ( $P < 0,084$ ). Από τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των τριών ηλικιών σφαγής στο ήπαρ, η τάση διαφοροποίησης στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης παρατηρήθηκε από την 1<sup>η</sup> στην 2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής. Το ίδιο διαπιστώθηκε και για την ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων, όπου η γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής

αφυδρογονάσης διαφοροποιήθηκε σημαντικά στο ήπαρ. Η διαφοροποίηση αυτή έλαβε χώρα από τη πρώτη στη δεύτερη ηλικία σφαγής και από τη δεύτερη στη τρίτη. Αυτό πιθανόν συνδέεται με τ'ότι ο όγκος των λιποκυττάρων στα ευνουχισμένα ορνίθια αυξήθηκε σημαντικά από την 1<sup>η</sup> στη 2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής (Συμεών 2009). Αντίθετα, στην ομάδα των μη ευνουχισμένων ορνιθίων δε διαπιστώθηκε καμία επίδραση της ηλικίας σφαγής στην έκφραση της μηλικής και ισοκιτρικής αφυδρογονάσης τόσο στο λιπώδη ιστό όσο και στο ήπαρ. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνεται και από την εργασία του Συμεών (2009) σύμφωνα με την οποία, ο όγκος των λιποκυττάρων στην ομάδα του μάρτυρα λόγω της μειωμένης εναπόθεσης λίπους, σε σχέση με την ομάδα των ευνουχισμένων, ενώ είχε μια αυξητική τάση ήταν πολύ μικρότερος σε σχέση με τον όγκο των λιποκυττάρων των ευνουχισμένων ορνιθίων. Επομένως, ο ευνουχισμός, είχε ως συνέπεια την αύξηση εναπόθεσης λίπους προιούσης της ηλικίας, αύξηση η οποία αποτυπώθηκε στον όγκο των λιποκυττάρων, στο ποσοστό του χημικού λίπους και στην έκφραση των δύο γονιδίων λιπογένεσης.

Δεν υπάρχουν αρκετές εργασίες στις οποίες να αναφέρεται η επίδραση της ηλικίας σφαγής στην έκφραση της μηλικής και ισοκιτρικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό των ευνουχισμένων ορνιθίων, αλλά σαφώς υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του ευνουχισμού και της ηλικίας αναφορικά με το ποσοστό του χημικού λίπους στο λιπώδη ιστό, καθώς και με την αύξησή του είτε με υπερπλασία είτε με υπερτροφία.

Όσο σε πιο νεαρή ηλικία πραγματοποιείται η σφαγή, τόσο πιο μικρή είναι η δράση του μηλικού ενζύμου καθώς και ο ρυθμός της ηπατικής λιπογένεσης. Η δράση του μηλικού ενζύμου αυξάνεται ταυτόχρονα με την αύξηση της ηπατικής λιπογένεσης, γεγονός που υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο αυτού του ενζύμου στη λιπογένεση (Goodridge, 1968b). Από την βιβλιογραφία φαίνεται ότι ο ρόλος της αφυδρογονάσης του ισοκιτρικού οξέος στη λιποσύνθεση των πτηνών είναι λιγότερο σημαντικός από αυτόν της μηλικής αφυδρογονάσης και το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη η γονιδιακή της έκφραση βρέθηκε ότι επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία σφαγής (σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασής της από την 1<sup>η</sup> στην 2<sup>η</sup> ηλικία σφαγής) είναι κάτι που χρήζει περαιτέρω έρευνα. Περαιτέρω έρευνα αναφορικά με την επίδραση του ευνουχισμού στην γονιδιακή έκφραση της μηλικής και ισοκιτρικής αφυδρογονάσης δε θεωρείται απαραίτητη καθώς τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με εκείνα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Μία μέτρια συσχέτιση μεταξύ των δύο αφυδρογονασών ως προς τη γονιδιακή έκφραση παρουσιάζει περιορισμένο ενδιαφέρον ( $r=0,398$ , και  $P<0,005$ ) και αυτό το εύρημα είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο μικρό σχετικά διαθέσιμο δείγμα ζώων.

## 2.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που εξάγονται από την πραγματοποίηση του πειράματος μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- ❖ Η επίδραση του ευνουχισμού δεν προκαλεί σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση των δύο αφυδρογονασών στο λιπώδη ιστό.
- ❖ Στο ήπαρ η επέμβαση του ευνουχισμού προκαλεί διαφοροποίηση στην γονιδιακή έκφραση της μηλικής αφυδρογονάσης που είναι οριακά σημαντική ( $P\leq 0,08$ ).
- ❖ Η ηλικία σφαγής βρέθηκε ότι οριακά επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ.
- ❖ Δε βρέθηκαν διαφορές ως προς τη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής και μηλικής αφυδρογονάσης ως προς την ηλικία σφαγής στο λιπώδη ιστό
- ❖ Στο ήπαρ παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ( $P<0,027$ ) από την πρώτη στη δεύτερη ηλικία σφαγής.
- ❖ Στην ομάδα των ευνουχισμένων ορνιθίων η γονιδιακή έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης διαφοροποιείται σημαντικά στο ήπαρ. Η διαφοροποίηση αυτή λαμβάνει χώρα από τη πρώτη στη δεύτερη ηλικία σφαγής και από τη δεύτερη στη τρίτη.
- ❖ Στο λιπώδη ιστό βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης της ICDH με την MDH αφυδρογονάση όπου  $F=0,398$  και  $P\text{-value}<0,003$ .

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. **Ahima R.S & Flier, J.S.** (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab*, **11**: 327-332.
2. **Akiba Y., Jensen L. S & Lillburn M. S.** (1982). Effect of estrogen implants on hepatic lipid deposition in chicks fed different isonitrogenous and isocaloric diets. *Journal of Nutrition*, **112**:189-196.
3. **Ballard F. J. & Hanson R. W.** (1967). Changes in lipid synthesis in rat liver during development. *Biochem. ft.*, **102** : 952-958.
4. **Barber M.C. & Travers M.T.** (1998). Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl CoA carboxylase a with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. *Biochem. J*, **333** : 17-25.
5. **Barber M.C., Price, N.T. & Travers, M.T.** (2005). Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim. Biophys. Acta*, **1733** : 1-28.
6. **Bensadoun A. & Martin R. A.** (1986). Dibutyryl cyclic-AMP decreases the rate of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **879** : 253-263.
7. **Bensadoun A. & Rothfield A.** (1972). The form of absorption of lipids in the chicken, *Gallus domesticus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, **41** : 814-817.
8. **Bergen, W.G. & Mersmann, H.J.** (2005). Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J. Nutr*, **135** : 2499-2502.
9. **Bjorntorp, P.** (1974). Effects of age, sex and clinical conditions on adipose tissue cellularity in man. *Metabolism*, **23** : 1091-1102
10. **Bjorntorp. P., Karlsson M. & Petterson P.** (1982). Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rats. *Metabolism Clinical and Experimental*, **31** : 366-373
11. **Borron D. C., Jensen L. S., McCartney M. G. & Britton W. M.** (1979). Comparison of lipoprotein lipase activities in chickens and turkeys. *Poult. Sci.* **58** : 659-662.
12. **Bortz, W. M., Abraham, S. & Chaikoff, I. L.** (1963). *J. biol. Chem.* **238** : 1266.
13. **Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W.** (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**: 597-601.
14. **Butterworth, P. H. W., Guchhait, R. B., Baum, H., Olson, E. B., Margiolis, S. A. & Porter, J. W.** (1966). *Arch Biochem. Biophys*, **116** : 453.

15. **Cartwright** A. L. (1991). Adipose cellularity in *Gallus domesticus*: Investigations to control body composition in growing chickens. *Journal of Nutrition*, **121**: 1486-1497.
16. **Cartwright** A. L., **Marks** H. L. & **Campion** D. R. (1988). Adipose cellularity in nonselected and selected broiler stocks : Measurement at equal weights and ages. *Poultry Science*, **67** : 1338-1344
17. **Cason**, J. A., D. L. **Fletcher**, & W. H. **Burke**. (1988). Effects of caponization on broiler growth. *Poult. Sci.* **67** : 979–981.
18. **Chen**, K. L., C. P. **Wu**, & R. G. R. **Chou**. (2000a). Effect of castration age on growth performance and postmortem change in muscles of Taiwan country chicken. *J. Agric. Assoc. Chin.* **1**: 54–63.
19. **Chen**, K. L., C. P. **Wu** & Y. M. **Hong**. (2000b). Meat quality and carcass traits of capon in comparison with intact male and female Taiwan country chickens. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* **29** : 77–88.
20. **Chen** K., **Chi** W. & **Chiou** P. (2005). Caponization and testosterone implantation effects on blood lipid and lipoprotein profile in male chickens. *Poultry Science*, **84** : 547-552.
21. **Chen**, K. L., M. H. **Chang**, S. M. **Tsay**, H. Y. **Hung**, & P. W. S. **Chiou**. (2006). Effects of caponization on bone characteristics and histological structure in chickens. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **19** : 245–251.
22. **Chen**, K. L., T. Y. **Hsieh** & P. W. S. **Chiou** (2006a). Caponization effects on growth performance and lipid metabolism in Taiwan country chicken cockerels. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **19** : 438–443.
23. **Chen** K. L., W. T., **Chu** C., **Chen** R. S. & **Chiou** P. W. S. (2007). Effect of caponisation and testosterone implantation on hepatic lipids and lipogenic enzymes in male chickens. *Poultry Science*, **86** : 1754-1759.
24. **Chilliard**, Y. (1993). Dietary Fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs and rodents: a review. *J. Dairy Sci.* **76** : 3897-3931.
25. **Chirala**, S.S., **Huang**, W.Y., **Jayakumar**, A., **Sakai**, K. & **Wakil**, S.J. (1997). Animal fatty acid synthase: Functional mapping and cloning and expression of the domain I constituent activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** : 5588-5593.
26. **Christie** W.W. Eds., (1981). Lipid metabolism in ruminant animal, Oxford, New York, *Pergamon Press*, pp: 279-362.

27. **Clark, S.D. & Abraham, S.**, (1992). Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events. *FASEB J.* **6** : 3146–3152.
28. **Cousin, B., Munoz, O., Andre, M., Fontanilles, A.M., Dani, C., Cousin, J.L., Laharrague, P., Casteilla, L. & Penicaud, L.** (1999). A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J.* **13** : 305-312.
29. **Dashti N., Kelley J. L., Thayer R. H. & Ontko J. A.** (1983). Concurrent inductions of avian hepatic lipogenesis, plasma lipids, and plasma apolipoprotein B by estrogen. *Journal of Lipid Research*, **24** : 368-380.
30. **Decuyper E. & Buyse J.** (2005). Endocrine control of postnatal growth in poultry. *Poultry Science*, **42** : 1-13.
31. **Donaldson, W.E.**, (1985). Lipogenesis and body fat in chicks: effects of calorie protein ratio and dietary fat. *Poultry Sci.* **6** : 1199–1204.
32. **Duclos M. J., Beccavin C. & Simon J.** (1999). Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. *Domestic Animal Endocrinology*, **17** : 231-243.
33. **Fennell, M. J. & C. G. Scanes.** (1992). Inhibition of growth in chickens by testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and 19-nortestosterone. *Poult. Sci.* **71** : 357–366.
34. **Fennell, M. J., A. L. Johnson, & C. G. Scanes** (1990). Influence of androgens on plasma concentration of growth hormone in growing castrated and intact chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77** : 466–475.
35. **Ford, J. J & J. Klindt**, (1989). Sexual Differentiations and the Growth Process. In: Animal Growth Regulation, Champion, D. R., G. J. **Hausman** & R. J. **Martin** (Eds). *Plenum Press, New York*, pp : 317-336.
36. **Freetly, H.C. & Klindt, J.** (1996). Changes in gut and liver glucose, lactate, insulin, and oxygen flux in mature ewes during mesenteric or abdominal vena cava glucose infusion. *J. Nutr.* **126** : 924-932.
37. **G. K. Symeon, F. Mantis, I. Bizelis, A. Komninakis, and E. Rogdakis** (2010). Effects of caponization on growth performance, carcass composition, and meat quality of medium growth broilers. *Poultry Science* **89**:1481-1489.
38. **Ganguly, J.** (1960). *Biochim. biophys. Acta*, **40**: 110.
39. **Gondret, F., Ferre, P. & Dugail, I.** (2001). ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *J. Lipid Res.* **42**: 106–113.

40. **Goodridge** A. G. (1968a). Citrate-Cleavage, 'Malic' Enzyme and certain Dehydrogenases in Embryonic and Growing Chicks. *Biochem. J.* **108** : 663-666.
41. **Goodridge** A. G. (1968b). Metabolism of glucose-U-14C *in vitro* in adipose tissue from embryonic and growing chicks. *Am. J. Physiol.* **214** : 897-901.
42. **Goodridge** A. G. (1968). The effect of starvation and starvation followed by feeding on enzyme activity and the metabolism of [U-14C] glucose in liver from growing chicks. *Biochem. J.* **108** : 667-673.
43. **Griffin** H. D., **Grant** G. & **Perry** M. (1982). Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase *in vitro*. *Biochem. J.* **206** : 647-654.
44. **Griffin**, H. D. & **Hermier** D. (1988). Plasma lipoprotein metabolism and fattening in poultry. In *Leaness in domestic birds*. Editors Leclercq, B., and Whitehead, C. C.. Butterworths, Essex. P : 175-201.
45. **Griffin**, H. D., **Butterwith**, S. C. & **Goddard** C. (1987). Contribution of lipoprotein lipase to differences in fatness between broiler and layer-strain chicks. *British Poultry Science*, **28** : 197-206.
46. **Griffin**, H.D., **Guo**, K., **Windsor**, D. & **Butterwith** S. C. (1992). Adipose tissue lipogenesis and fat deposition in leaner broiler chickens. *Journal of Nutrition*, **122** : 363-368.
47. **Grunder** A. A., **Chambers** J. R. & **Fortin** A. (1987). Plasma very low density lipoproteins, abdominal fat lipase and fatness during rearing in two strains of broiler chickens. *Poultry Science*, **66** : 471-479.
48. **Guay**, C., **Murthy**, M., **Madiraju**, S.R., **Aumais**, A., **Joly**, É. & **Prentk**, M. (2007). A Role for ATP-Citrate Lyase, Malic Enzyme, and Pyruvate/Citrate Cycling in Glucose-induced Insulin Secretion. *Biol. Chem.* **282** : 35657-35665.
49. **Ha**, J., **Lee**, J.K., **Kim**, K.S., **Witters**, L.A. & **Kim** K.H. (1996). Cloning of human acetyl-CoA carboxylase- $\beta$  and its unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 11466-11470.
50. **Harvey**, S., **Scanes**, C. G. & **Howe**, T. (1977). Growth hormone effects on *in vitro* metabolism of avian adipose and liver tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* **33** : 322-328.
51. **Haug** A., **Spydevold** O. & **Hostmark** A. T. (1984). Plasma lipoprotein responses to castration and androgen substitution in rats. *Metabolism.* **33** : 465-470.



52. **Haugh A., Spydevold O. & Hostmark A. T.** (1985). Effect of orchidectomy and testosterone substitution on enzyme activities and DNA content in rat liver and epididymal fat. *International Journal of Biochemistry*, **17**: 31-36.
53. **Hermier D.** (1997). Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *Journal of Nutrition*, **127** : 805S-808S.
54. **Hermier D., Chapman M. J. & Leclercq B.** (1984). Plasma lipoprotein profile in fasted and refed chickens of two lines selected for high or low adiposity. *J. Nutr.* **114** : 1112-1121.
55. **Hesketh, J.E., Vasconcelos, M.H. & Bermano G.,** (1998). Regulatory signals in messenger RNA: determination of nutrient–gene interaction and metabolic compartmentation. *Br. J. Nutr.* **80** : 307–321.
56. **Hillgartner F. B., Salati L. M. & Goodridge A. G.** (1995). Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* **75** : 47-76.
57. **Hood R. L. & Allen C. E.** (1973). Cellularity of bovine adipose tissue. *Journal of Lipid tissue. Journal of Lipid Research*, **14** : 605-616
58. **Hood R. L.** (1982). The cellular basis for growth of the abdominal fat pad in broiler-type chickens. *Poultry Science*, **61** : 117-121.
59. **Hood, R.L. & Thornton, R.F.** (1979). The cellularity of ovine adipose tissue. *Aust. J. Agric. Res.* **30** : 153-161.
60. **Hsu J. C. & Lin C. Y.** (2003). Influence of caponisation on the carcass characteristics in Taiwan country chicken cockerels. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, **16** : 575 (abstr.).
61. **Husbands D. H. R. & Brown W. O.** (1965). Sex differences in the composition and acetate incorporation into liver lipids of the adult fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* **14** : 445-451.
62. **Ingle, D.L., Bauman, D.E. & Garrigus, U.S.** (1972). Lipogenesis in the ruminant: In vivo site of fatty acid synthesis in sheep. *J. Nutr.* **102** : 617-624.
63. **Kilsheimer G. S., Weber D. R. & Ashmore J.** (1960). Hepatic glucose production in developing chicken embryo. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **104** : 515-518.
64. **Kim, K.H. & Tae, H.J.** (1994). Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.* **124** : 1273-1283.
65. **Kim, K.H.** (1997). Regulation of mammalian acetyl-coenzyme a carboxylase. *Ann. Rev. Nutr.* **17** : 77-99.

66. **Kouba, M., Catheline, D. & Leclercq, B.** (1992). Lipogenesis in turkeys and chickens: A study of body composition and liver lipogenic enzyme activities. *British Poultry Science*, **33** : 1003-1014.
67. **Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B. & Strombom L. et al.,** (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27** : 95-125.
68. **Laliotis G. P., Bizelis I. & Rogdakis E.,** (2010). Comparative Approach of the novo Fatty Acid Synthesis (Lipogenesis) between Ruminant and Non Ruminant Mammalian Species : From Biochemical Level to the Main Regulatory Lipogenic Genes. *Current Genomics*, **11**:168-183.
69. **Langslow, D. R. & Hales, C. N.** (1971). Lipolysis in chicken adipose tissue *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, **43**: 285-294.
70. **Langslow, D. R.** (1972). The development of lipolytic sensitivity in the isolated fat cells of Gallus Domesticus during the foetal and neonatal period. *Comp. Biochem. Physiol.* **43b** : 689-701.
71. **Lawrence, J. L.J. & V. R. Fowler,** (2002). Growth of farm Animals. *Hormonal Influences on Growth 2<sup>nd</sup> Edn., CAB International, Ox, UK.,* pp : 135-138.
72. **Leclercq, B.** (1984). Adipose tissue metabolism and its control in birds. *Poultry Science*, **63**: 2044-2054.
73. **Lee S. M., Huh T. L. & Park J. W.** (2001). Inactivation of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by reactive oxygen species. *Biochimie*, **83** : 1057-1065.
74. **Legrand, P., J. Mallard, M. A. Bernard-Griffiths, M. Douaire, & P. Lemarchal.** (1987). Hepatic lipogenesis in genetically lean and fat chickens. *In vitro* studies. *Comp. Biochem. Physiol.* **87B** : 789–792.
75. **Leveille G. A.** (1969). *In vitro* hepatic lipogenesis in the hen and chick. *Comp. Biochem. Physiol.* **28** : 431-435.
76. **Leveille, G. A., Romsos, D. R., Yeh, Y. & O’Hea, E. K.** (1975). Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* **54** : 1075–1093.
77. **Lewille G. A., O’hea E. K. & Chakrabarty K.** (1968). In vivo lipogenesis in the domestic chicken. *Proc. Soc. exp. Biol.* **128** : 398-401.
78. **Lin, C. Y. & J. C. Hsu,** (2002). Effects of surgical caponization on growth performance, fiber diameter and some physical properties of muscles in Taiwan country chicken cockerels. *Asia-Aust. J. Anim. Sci.* **15** : 401-405.

79. **Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) *Method. Methods* **25**: 402-408.
80. **Lyon, I., Masri, M. S. & Chaikoff, I. L.** (1952). *J. biol. Chem.* **196** : 25.
81. **Maglieri, J. A., Shepherd, R. E. & Fein, J. N.** (1975): Lack of feed back regulation of cyclic 3:5 AMP accumulation by free fatty acids in chicken fat cells. *Journal of Biological Chemistry*, **250** : 6593-6598.
82. **Maret, W.** (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* **130** : 1455S–1458S.
83. **Mast M.G., Jordan H.C. & Macneil J.H.,** (1981). The effect of partial and complete caponization on growth rate, yield, and selected physical and sensory attributes of cockerels, *Poult. Sci.* **60** : 1827–1833.
84. **Mayes, P.A. & Botham, K.M.** (2003). Biosynthesis of fatty acids. In Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. *Eds. Harper's Illustrated Biochemistry.* 26th ed. McGraw-Hill, pp : 173-179.
85. **Miguel, J. A., J. Ciria, B. Asenjo & J. L. Calvo,** (2008). Effect of caponisation on growth and on carcass and meat characteristics in castellana Negra native Spanish Chickens. *Animal J.* **2** : 305-311.
86. **Miller L. E., Krista L. M., Brake j., Bolden S. L., McDaniel G. R. & Mora E.** (1985). Effects of caponisation on body weight, atherosclerosis and cardiovascular variables in hypertensive and hypotensive turkey lines. *Poultry Science*, **64** : 1002-1014.
87. **Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H. & Coppack, S.W.** (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes.* **22** : 1145-1158.
88. **Mooney R. A. & Lane M. D.** (1981). Formation and turn-over of triglyceride-rich vesicles in chick liver. *J. Biol. Chem.* **256** : 11724-11733.
89. **Muriel Duran A.** (2004). The effect of caponization on production indices and carcass and meat characteristics in free-range extrmena azul chickens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **2**:211-216.
90. **Nafikov, R.A. & Beitz, D.C.** (2007). Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J. Nutr.* **137** : 702-705.
91. **Nir, I., Nitsan, Z. & Keren-zvi, S.** (1988). Fat deposition in birds. In Leanness in domestic birds. Editors Leclerq, B., & Whitehead, C. C. *Butterworths, Essex.* pp. :141-174.

92. **Novello, F. & Mclean, P.** (1968). The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Measurement of the non-oxidative reactions of the cycle. *Biochem. J.*, **107** :775-791.
93. **O’hea, E.K. & Leveile, G.A.** (1968). Lipogenesis in isolated adipose tissue of the domestic chic (*Gallus domesticus*): *Comp. Biochem. Physiol.* **26** : 111-120.
94. **Pearce J. & Brown W. O.** (1971). A comparison of liver lipogenic enzyme activity in the immature female fowl treated with gonadal hormones and in the mature fowl. *International Journal of Biochemistry*, **2** : 337-344.
95. **Pearce J.** (1971). An investigation of lipogenic and glycolytic enzyme activity in the liver of sexually immature and mature domestic fowl. *Biochem.* **37** **123** : 717-719.
96. **Pearce J.** (1972). Changes in the activities of the lipogenic enzymes ATP-citrate lyase and the malic enzyme, in the liver of the female domestic fowl (*Gallus domesticus*) from four weeks of age to adulthood. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part B, **42** : 721-724.
97. **Pearce J.** (1974). A study of changes in the specific activities of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the liver of the domestic fowl with the onset of sexual maturity. *International Journal of Biochemistry*, **5** : 457-462.
98. **Pownall, H. J.** (2001). Cellular transport of nonesterified fatty acids. *J. Mol. Neurosci.* **16** : 109–115, discussion 151–157.
99. **Raham, M. A., S. D. Ross, R. C. Fanguy & D. T. Hyatt,** (1984). The influence of gonadal development on lipid accretion in commercial broilers. *Poult. Sci.* **63** : 167-167.
100. **Richards M. P., Poch S. M., Coon C. N., Rosebrough R. W., Ashwell C. M. & McMurtry J. P.** (2003). Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. *Journal of Nutrition*, **133** : 707-715.
101. **Rodoman, G. V., T. I. Shalaeva, & G. E. Dobretsov.** (2001). Blood fatty acid transporters in acute pancreatitis. *Vopr. Med. Khim.* **47** : 633–641.
102. **Rogdakis, E.** (1982). Selektion mach der Activitaet NADPH-liefernder Enzyme im Fettgewebe des Schweines. I. Versuchsfrage, Versuchsanlage und erste Ergebnisse. *Z. Tierzuecht. Zuechtgbiol.* **99** : 241-252.
103. **Rogdakis, E., Charismiadou, M., Orphanos, S., Panopoulou, E. & Bizelis, J.** (1997). Cellularity and enzymatic activity of adipose tissue in the Karagouniko dairy breed of sheep from birth to maturity. *J. Anim. Breed. Genet.* **11** : 4385-396.

104. **Rosebrough, R.W., McMurtry, J.P. & Steele, N.C.**, (1989). Protein and energy relations in the broiler chicken. *Br. J. Nutr.* **61** : 223–230.
105. **Rosebrough, R.W., Mitchell, A.D., Von Vleck, M.F. & Steele, N.C.**, (1990). Protein and energy relations in the broiler chicken. *Br. J. Nutr.* **64** : 515–523.
106. **Russell, D. W.**, (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **6**: 103-110.
107. **Ryder E.** (1970). Effect of development on chicken liver acetyl-CoA carboxylase. *Biochem.J.* **119** : 929-930.
108. **Salati LM. & Amir-Ahmady B.** (2001). Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annual Review of Nutrition* **21**: 121-140.
109. **Shapira N., Nir I. & Budowski P.** (1978). Response of lipogenic enzymes to overfeeding in liver and adipose tissue of light and heavy breeds of chicks. *British Journal of Nutrition*, **39** : 151-157.
110. **Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A. H., Osuga, J.-I., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S. & Yamada, N.** (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* **274** : 35832–35839.
111. **Sklan, D., Geva, A., Budowsky, P. & Hurvitz, S.** (1984). Intestinal absorption and plasma transport of lipids in chicks and rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **78a**: 507-510.
112. **Snapir N., Nir I., Furuta F. & Lepkovsky S.** (1974). Effects of functional and surgical castration of white leghorn cockerels, and replacement therapy, on food intake, obesity, reproductive traits, and certain components of blood, liver, muscle and bone. *General and Comparative Endocrinology*, **24**: 53-64.
113. **Snapir N., Robinzon B. & Shalita B.** (1983). The involvement of gonads and gonadal steroids in the regulation of food intake, body weight and adiposity in the white Leghorn cock. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **19** : 617-624.
114. **Sturkie, P. D.**, (1976). Avian physiology In *Lipid Metabolism*, Griminger, P. (ED). Springer- Verlag, Inc., New York.
115. **Summers, J.D., Spratt, D. & Atkinson, J.L.**, (1992). Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy, and protein level. *Poultry Sci.* 263–273.

116. **Tanaka, K., J. C. Hsu, S. Ohtani, & C. M. Collado** (1986). Changes in the activities of hepatic lipogenic related enzymes and in the concentrations of various plasma and liver lipid fractions in hens before and after the onset of laying. *Jpn. Poult. Sci.* **23**: 203–210.
117. **Tanaka, K., Ohtani, S., & Shigeno, K.** (1983). Effect of increasing dietary energy on hepatic lipogenesis in growing chicks. I. Increasing energy by carbohydrate supplementation. *Poultry Science*, **62** : 445-451.
118. **Tarlow D. M., Watkins P. A., Reed R. E., Miller R. Z., Zwergel E. E. & Lane M. D.** (1977). Lipogenesis and the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by avian liver cells in nonproliferating monolayer culture. Hormonal effects. *J. Cell Biol.* **73** : 332-353.
119. **Taylor C. B., Bailey E. & Bartley W.** (1967). Changes in hepatic lipogenesis during development of the rat. *Biochem.* **37**. **105** : 717-722.
120. **Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeir, K.M., Xi, Q.C., Tian, X. & Stanton, R.C.** (1998). Importance of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol Chem.* **273** : 10609-10617.
121. **Tor, M., J. Estany, D. Villaba, E. Molina, & D. Cubilo** (2002). Comparison of carcass composition by parts and tissues between cocks and capons. *Anim. Sci* : 421-431.
122. **Trayhurn, P. & Beattie, J.H.** (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60** : 329-339.
123. **Trayhurn, P. & Wood, I.S.** (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem. Soc. Trans*, **33**: 1078-1081.
124. **Tsai, C. H.** (2004). Effects of castration and testosterone implantation on growth, energy retention, and energy consumption of tissues in male chickens. MS Thesis. *University of Chung-Hsing, Taichung, Taiwan.*
125. **Vernon, R.G., Denis, R.G.P. & Sorensen, A.** (2001). Signals of adiposity. *Domestic Anim. Endocrinol.* **21** : 197-214.
126. **Weiss, J. F., E. C. Naber & R. M. Johnson** (1967). Effect of dietary fat and cholesterol on the *in vitro* incorporation of acetate-<sup>14</sup>C into hen liver and ovarian lipids. *J. Nutr.* **93**: 142.
127. **Welter J.F.,** (1976). The effects of surgical caponization on production efficiency and carcass yield of roosters, *Poult. Sci.* **55** : 1372–1375.

128. **Whitehead, C. C. & Griffin, H. D.** (1982). Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broilers: effect of age and diet. *British Poultry Science*, **23** : 299-305.
129. **Wood, T.M.** (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.*, **13**:407-410.
130. **Xu, T., X. Wang, S Hou, J. Zhu, X. Zhang & X. Huang** (2002). Effect of surgical castration on risk factors for arteriosclerosis of patients with prostate cancer. *Chin. Med. J. Engl.* **115**: 1336-1340.
131. **Yeh Y. Gilbert A. Leveille & Joyce H. Wiley** (1970). Influence of Dietary Lipid on Lipogenesis and on the Activity of Malic Enzyme and Citrate Cleavage Enzyme in Liver of the Growing Chick. *J. Nutr.*
132. **Zhang, Y.Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M.** (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature*, **372** : 425-432.
133. **Γκολιομύτης Μ.** (2000). Εξέλιξη του σωματικού βάρους και των επιμέρους τεμαχίων του σφαγίου, δύο υβριδίων κρεοπαραγωγικών ορνιθίων, από την εκκόλαψη έως την ενηλικίωση. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, *Διδακτορική Διατριβή* Σελ : 62-69.
134. **Ρογδάκης Ε.** (1991). Το πρόβλημα της υπερβολικής εναποθέσεως σωματικού λίπους στα ορνίθια κρεοπαραγωγής και οι τρόποι αντιμετώπισεώς του. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης, Ειδική έκδοση* : 27-48.
135. **Συμεών Γ.** (2009). Επίδραση του ευνουχισμού σε παραγωγικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά αρσενικών ορνιθίων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, *Διδακτορική Διατριβή* Σελ : 63-66.