

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“Προσδιορισμός της επίδρασης αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος
θαλάσσιου φύκους σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα”

“Determination of the effect of antioxidant activity of marine extract algae
in human mesenchymal cells”

Τάφα Μουσταφά του Νεχμί,
Λάρισα 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ: Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Στάγκο Δημήτριο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της αυτού το θέματος, αλλά και για την άψογη συνεργασία που είχαμε σε όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γούτα Ανδρέα, ο οποίος καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας με βοήθησε με την εμπειρία του και φρόντισε να υπάρχει ένα άψογο και ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τραχανά Βαρβάρα, υπεύθυνη του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας και τον κ. Γιακουνή Αντώνιο, πρωτίστως για την προθυμία τους να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια τους στην εκπόνηση της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου για της στήριξη τους όχι μόνο στο κομμάτι των σπουδών μου αλλά γενικότερα σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Περίληψη

Ως οξειδωτικός στρες έχει οριστεί η διαταραχή ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού. Προκαλείται από την υπερβολική συσσώρευση ελευθέρων ριζών, κυρίως δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) εντός των κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε κρίσιμες διεργασίες όπως είναι η κυτταρική σηματοδότηση και η άμυνα έναντι ξеноβιοτικών ουσιών. Ωστόσο μια υπερβολική αύξηση των επιπέδων ROS προκαλεί βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια το οποίο οδηγεί σε κατάσταση οξειδωτικού στρες και η οποία με τη σειρά της διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία και δομή των υγιών κυττάρων. Ουσίες οι οποίες μπορούν να μειώσουν τις ελεύθερες ρίζες είναι οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή και οι θειικοί πολυσακχαρίτες. Τέτοιες ουσίες έχει δείχθει ότι αποτελούν συστατικά των θαλάσσιων μακροφυκών. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης αντιοξειδωτικής δράσης σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (WJ-MSCs) εκχυλίσματος (HME) του μακροφύκου *Hypnea musciformis* το οποίο συλλέχθηκε από το Αιγαίο Πέλαγος.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος αρχικά εξετάστηκαν οι επιδράσεις του HME σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στην αντιοξειδωτική κατάσταση των WJ-MSCs είτε χωρίς είτε υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες προκαλούμενου από H_2O_2 . Για τον σκοπό αυτό εκτιμήθηκαν οι αλλαγές στους οξειδωτικούς δείκτες TBARS, CRAB και TAC ενώ μετρήθηκαν και τα επίπεδα της GSH. Ταυτόχρονα προσδιορίστηκαν μέσω μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού τα επίπεδα ROS και η προστασία έναντι των βλαβών του DNA προκαλούμενων από οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το HME προστάτευσε από οξειδωτικό στρες τα κύτταρα μειώνοντας τους δείκτες TBARS και CARB, και ROS, και αυξάνοντας τα επίπεδα της GSH. Δεν υπήρξε μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Επίσης, το HME προστάτευσε τα κύτταρα από βλάβες του DNA προκαλούμενες από ROS.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση του HME στο μονοπάτι του Nrf2, ενός από τους πιο σημαντικούς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ύστερα από επίδραση των κυττάρων με το εκχύλισμα HME υπήρξε αύξηση στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα τόσο του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 όσο και αντιοξειδωτικών ενζύμων που ρυθμίζονται μεταγραφικά από αυτόν, των GCLC, GSR, HMOX1, SOD1, TXN και GPX1. Τέλος επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του Nrf2 καθώς με την επίδραση του HME αυξήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στο πυρηνικό κλάσμα των κυττάρων, ενώ με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων χρώσης του στον πυρήνα των κυττάρων.

Abstract

Oxidative stress is defined as the disturbance between the pro-oxidant and antioxidant balance of the organism. It is caused by the excessive accumulation of free radicals, mainly reactive oxygen species (ROS) within the cells. Under physiological conditions, ROS play an important role in critical processes such as cell signaling and defense against xenobiotics. However, an excessive increase in ROS levels causes damage to critical biomolecules leading to oxidative stress, which in turn disrupts the normal function and structure of healthy cells. Substances that can reduce free radicals are polyphenols, carotenoids and sulfated polysaccharides. Such substances have been shown to be compounds of marine macroalgae. The aim of the present study was to assess the antioxidant effect in human mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) of an extract (HME) of the macroalga *Hypnea musciformis* which was collected from the Aegean Sea.

To assess the antioxidant activity of the extract, firstly the effects of HME at non-cytotoxic concentrations on the antioxidant status of WJ-MSCs either without or under the influence of H₂O₂-induced oxidative stress were examined. For this purpose, the changes in the oxidative markers TBARS, CRAB and TAC were assessed, while GSH levels were also evaluated. At the same time, ROS levels and protection against oxidative stress-induced DNA damage were determined by immunofluorescence microscopy. The results showed that HME protected cells from oxidative stress by reducing TBARS, CARB, and ROS markers, and by increasing GSH levels. There was no change in total antioxidant capacity (TAC). Moreover, HME protected cells from ROS-induced DNA damage.

Then, the effect of HME on the Nrf2 pathway, one of the most important antioxidant defense mechanisms, was investigated. The results showed that after exposure of the cells to the HME extract there was an increase in the transcriptional and protein levels of both the gene encoding the transcription factor Nrf2 and antioxidant enzymes regulated transcriptionally by Nrf2, that is, the enzymes GCLC, GSR, HMOX1, SOD1, TXN and GPX1. Finally, the activation of Nrf2 was confirmed as cells' treatment with HME increased the protein levels of Nrf2 in the nuclear fraction of the cells, while an increase in Nrf2's staining levels was observed in the nucleus of the cells using immunofluorescence microscopy.

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	7
1.1.1 Ορισμός.....	7
1.1.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών	7
1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)	9
1.1.4 Οξειδωτικό στρες	10
1.1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	11
1.2 Nrf2	13
1.3 Ένζυμα-στόχοι του NRF2.....	16
1.4 Τα θαλάσσια μακροφύκη (Macroalgae ή Seaweeds)	21
1.4.1 <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamouroux	21
1.4 ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ	22
1.5.1 Τι είναι τα βλαστοκύτταρα.	22
1.5.2 Δυναμικό διαφοροποίησης βλαστοκυττάρων (potency)	23
1.5.3 Βιολογική προέλευση και πηγές βλαστοκυττάρων.	24
1.5.4. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs).....	26
1.5.5 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από την γέλη του Wharton(WJ-MSCs)	26
2. Σκοπός	27
3.Υλικά και Μέθοδοι	28
3.1 Εκχύλισμα.....	28
3.2 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs)	28
3.3 Επιδράσεις στα μεσεγχυματικά καλλιεργούμενα κύτταρα με το HME.....	29
3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	30
3.4.1 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)	30
3.4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS).....	31
3.4.3 Προσδιορισμός των επιπέδων GSH	32
3.4.4 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	33
3.5 Ανοσοφθορισμός για την εκτίμηση των επιπέδων ROS	34
3.6 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).....	34

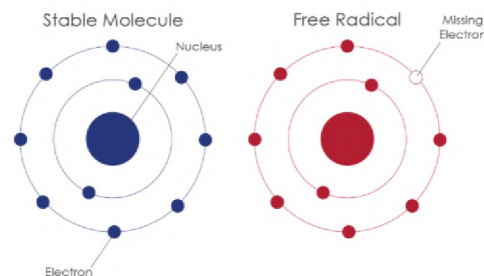
3.7 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS και Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot	38
3.8 Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της Nrf2 πρωτεΐνης	43
3.9 Υποκυτταρική κλασματοποίηση για τον προσδιορισμό της Nrf2 πρωτεΐνης.....	43
3.10 Προσδιορισμός της προστασίας από βλάβες του DNA στα Wj-MSCs κύτταρα με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.....	44
3.11 Στατιστική ανάλυση	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
5. Συζήτηση	55
6. Βιβλιογραφία	58

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

1.1.1 Ορισμός

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο, μόριο ή ιόν το οποίο διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα , γεγονός το οποίο το καθιστά ιδιαίτερα ασταθές και άρα πολύ δραστικό (Ci Gutteridge & Halliwell, n.d.). Λόγω της αστάθειας αυτής και της έντονης χημικής τους δραστικότητας, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να αντιδρούν με αφόρτιστα μόρια οξειδώνοντάς τα και μετατρέποντάς τα και αυτά σε ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την εκκίνηση ενός καταρράκτη αλυσιδωτών αντιδράσεων , ο οποίος μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για ολόκληρο το κύτταρο (Halliwell & Gutteridge, 1990a). Επίσης, μπορούν να αντιδράσουν και μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή ή/και πολυμερή.



Εικόνα 1 Δημιουργία Ελεύθερης Ρίζας

1.1.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να οφείλεται τόσο σε εξωγενείς όσο και σε ενδογενείς παράγοντες.

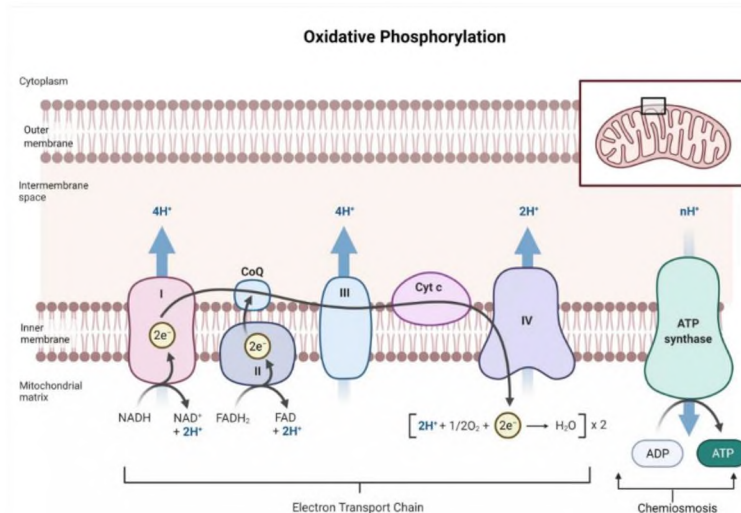
Εξωγενείς: Πηγές εξωγενών ελευθέρων ριζών αποτελούν περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) και το όζον (O_3) καθώς επίσης και τα βιομηχανικά απόβλητα και η χρήση εντομοκτόνων και φυτοφαρμάκων. Ατομικές συνήθειες όπως το κάπνισμα, το αλκοόλ και το στρες συμβάλλουν επίσης στην ενίσχυση της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Τέλος σημαντικό ρόλο παίζουν και οι διατροφικές συνήθειες καθώς είναι απαραίτητη η λήψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων μέσω της τροφής τα οποία λειτουργούν ως συμπαράγοντες αντιοξειδωτικών ενζύμων (Halliwell & Gutteridge, 1990a).



Εικόνα 2 Εξωγενείς πηγές Ελευθέρων Ριζών

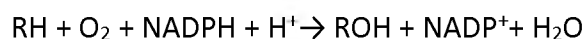
Ενδογενείς: Ελεύθερες ρίζες παράγονται ενδογενώς υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, όπως είναι η καταστολή της φλεγμονής μέσω της επαγωγής της διαδικασίας της φαγοκύτωσης, η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της διακυτταρικής επικοινωνίας καθώς και η επαγωγή αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων (Halliwell & Gutteridge, 1990a).

Αναπνευστική αλυσίδα: Βασική ενδογενή πηγή αποτελούν τα μιτοχόνδρια στα οποία πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά την παραγωγή ATP μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το NADH ή/και το $FADH_2$ προς O_2 το οποίο τελικώς ανάγεται προς H_2O . Ωστόσο, κατά την διαδικασία αναγωγής ορισμένα ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες με την μορφή των ROS.



Εικόνα 3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια

Κυτόχρωμα P450: Τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 αποτελούν τα κύρια ένζυμα που καταλύουν την αντιδράσεις της φάσης I της αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών ουσιών και εντοπίζονται κυρίως στα ηπατοκύτταρα αλλά και στο δέρμα, στους πνεύμονες και στην καρδιά. Σε επίπεδο κυττάρου εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στο διαλυτό κλάσμα του κυτταροπλάσματος, στα λυσοσώματα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα. Τα ένζυμα αυτά οξειδώνουν ξενοβιοτικές αλλά και ενδογενείς ενώσεις, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NAD(P)H στο O₂, οξειδώνοντας το υπόστρωμα (RH) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν την τάση να μετατρέπουν τα ξενοβιοτικά σε ελεύθερες ρίζες αυξάνοντας έτσι την τοξικότητα τους και εκθέτοντας τον οργανισμό σε κίνδυνο.

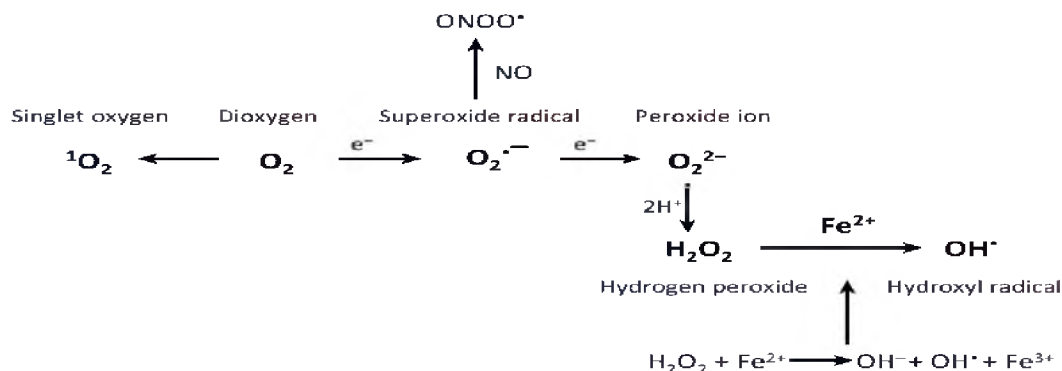
Υπεροξειδιοσώματα: Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μονομεβρανικά οργανίδια τα οποία χαρακτηρίζονται ως οξειδωτικά διότι συμμετέχουν στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το οξύ στο FAD προς σχηματισμό FADH₂ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O₂, από το οποίο τελικά θα προκύψει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (Pal et al., 2016). Η διάσπαση των υποστρωμάτων ενδέχεται να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες οι οποίες είναι επιβλαβείς για το κύτταρο.

1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)

Ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ορίζονται οι ενώσεις οι οποίες προκύπτουν από οξείδωση του μοριακού οξυγόνου O₂ και την απώλεια ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων καθώς επίσης και οι ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια τα οποία προκύπτουν από την αντίδρασή τους με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ρίζες του αλκοξυλίου (RO•), περοξυλίου (ROO•), σουπεροξειδίου (O₂•-), υδροξυλίου (OH•) και υδροπεροξυλίου (HO₂•). Στις ROS συμπεριλαμβάνονται και ενώσεις οι οποίες δεν είναι ρίζες

αλλά αποτελούν παράγωγα του οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του H_2O_2 , το υποβρωμιώδες οξύ (HOBr) και το μονήρες οξυγόνο (O_2).

Μια ακόμη μεγάλη κατηγορία ενεργών μορφών αποτελούν οι Ενεργές Μορφές Αζώτου (RNS), στις οποίες το κεντρικό άτομο είναι το άζωτο, με τις πιο κύριες να είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το διοξείδιο του αζώτου (NO_2), το υπεροξυνιτρώδες (ONOO^-), το τριοξείδιο του δινιτρογόνου ($\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$), κ.α. Αρχικά το NO αντιδρά με το O_2 και μέσω της NO συνθάσης σχηματίζεται το πολύ δραστικό ONOO^- το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με άλλα μόρια για να σχηματίσει άλλα RNS, όπως NO_2^- , NO_3^- (Ma, 2013).

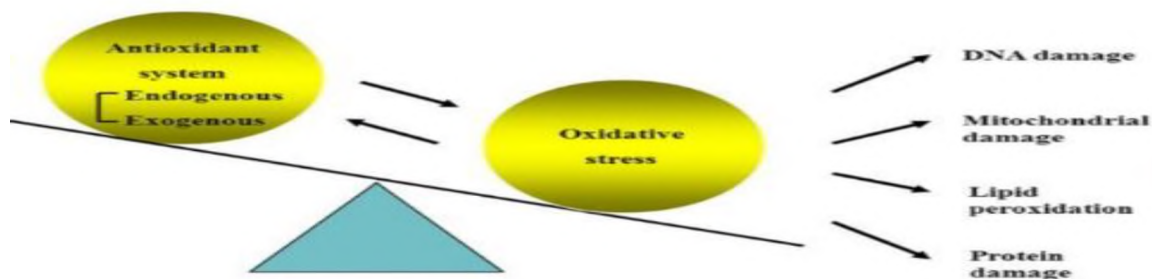


Εικόνα 4 Παραγωγή δραστικών $\text{OH}^\cdot$ και ONOO^- από το O_2^{2-}

1.1.4 Οξειδωτικό στρες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου εκτός από τις δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να έχουν για τον οργανισμό, συμμετέχουν και σε λειτουργίες σημαντικές για την επιβίωσή του. Κρίνεται επομένως απαραίτητο για τον οργανισμό να διατηρεί μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του (Pisoschi & Pop, 2015). Ο όρος οξειδωτικό στρες έχει οριστεί ως μια διαταραχή ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των αμυντικών συστημάτων του και σε οξείδωση μορίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA.

Η ανισορροπία αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) σε συνδυασμό με φυσιολογική παραγωγή αντιοξειδωτικών, είτε σε φυσιολογική παραγωγή δραστικών μορφών αλλά μειωμένη παραγωγή ή/ δράση των αντιοξειδωτικών, είτε τέλος σε συνδυασμό αυξημένης παραγωγής δραστικών μορφών και μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού.

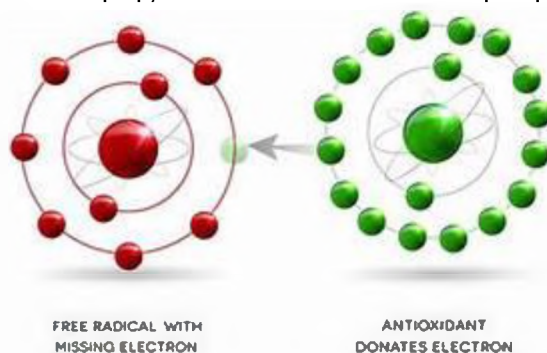


Εικόνα 5 Ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικού μηχανισμού

1.1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Δεδομένου ότι ο οργανισμός εκτίθεται σε μια πληθώρα ελευθέρων ριζών οι οποίες προκαλούν σοβαρές βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια για την επιβίωσή του, κατανοούμε ότι η ανάπτυξη μηχανισμών οι οποίοι θα μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την προκαλούμενη οξειδωτική βλάβη κρίνεται απαραίτητη (Halliwell & Gutteridge, 1990b). Σημαντικό μέρος των αντιοξειδωτικών μηχανισμών αποτελούν τα αντιοξειδωτικά μόρια. Διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, έχοντας πολλές φορές συνεργιστική δράση και δρουν με τους εξής τρόπους:

- Σπάζοντας την αλυσίδα αντίδρασης των ελευθέρων ριζών μέσω αναγωγής ή οξείδωσής τους με αποτέλεσμα να μετατρέπονται οι ίδιες σε σταθερές αδρανείς ρίζες (Young & Woodside, 2001).
- Δεσμεύοντας μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe) και αποτρέποντάς τα να συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton (Rice-Evans & Diplock, 1993).
- Συμβάλλοντας στην επιδιόρθωση των προκαλούμενων βλαβών.
- Και τέλος αυξάνοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων των ROS μέσω τροποποίησής των ρυθμιστικών περιοχών τους.



Εικόνα 6 Δράση αντιοξειδωτικών

Εξωγενή αντιοξειδωτικά

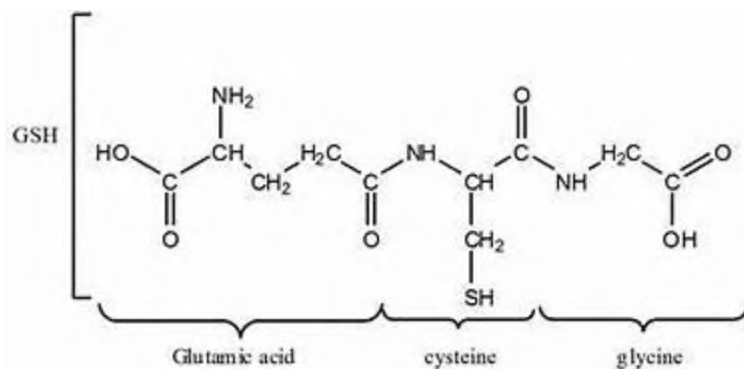
Ως εξωγενή αντιοξειδωτικά αναφέρονται εκείνα τα οποία δεν παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό αλλά προσλαμβάνονται μέσω των τροφών και των συμπληρωμάτων διατροφής. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν:

- **Βιταμίνη E:** Είναι λιποδιαλυτή και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Δρα μειώνοντας τις λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες ($\text{LOO}^\cdot$), μεταφέροντας το φαινολικό άτομο υδρογόνου του χρωμανικού δακτυλίου και δημιουργώντας μέσω συντονισμού μια σταθερή και αδρανή ρίζα η οποία δεν είναι σε θέση να προκαλέσει περαιτέρω υπεροξείδωση των λιπιδίων (Arredondo ML, 2016).
- **Βιταμίνη C:** Είναι υδατοδιαλυτή και εντοπίζεται στα εξωκυττάρια υγρά. Αποτελεί έναν ιδανικό δότη ηλεκτρονίων, ενώ μπορεί να λειτουργήσει και ως προοξειδωτικός αναγωγικός παράγοντας δεσμεύοντας ιόντα χαλκού και σιδήρου. Τέλος είναι απαραίτητη για την αναγέννηση της βιταμίνης E από την οξειδωμένη μορφή της, επαναφέροντας την στην ενεργή της μορφή (Arredondo ML, 2016).
- **Φλαβονοειδή:** Τα φλαβονοειδή είναι ο κύριος τύπος των φαινολικών ενώσεων στα φυτά και σε ορισμένους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Διαθέτουν υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό το οποίο τα καθιστά απαραίτητα για την αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Walter M. et al., 2011).
- **Καροτενοειδή:** Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα φυσικών χρωστικών που παράγονται από φυτά και φύκια, καθώς και από ορισμένα βακτήρια και μύκητες. Η μακρά αλκυλική αλυσίδα υδατανθράκων που διαθέτουν τα καθιστά ιδιαίτερα λιποδιαλυτά και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην προστασία των λιποπρωτεϊνών και της κυτταρικής μεμβράνης από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Rahman K., 2007).

Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τόσο ενζυμικούς όσο και μη ενζυμικούς μηχανισμούς. Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν ένζυμα όπως η καταλάση (CAT), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) κ.α, ενώ στα μη ενζυμικά ανήκουν το σύστημα της γλουταθειόνης και το ουρικό οξύ.

- **Γλουταθειόνη:** Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονηθειόλη (SH) του οργανισμού και αποτελείται από τρία πεπτίδια, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Διαθέτει αναγωγικές – αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων οργανισμών. Λειτουργεί επίσης ως συνένζυμο για πολλά ένζυμα ενώ είναι σημαντική και για τον μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και για την σωστή λειτουργία των αιμοπεταλίων και της κυτταρικής μεμβράνης (Pócsi et al., 2004).



- **Ουρικό οξύ:** Αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό το οποίο εκτιμάται ότι συντελεί στο ~60% της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών στο πλάσμα (Ames et al., 1981).

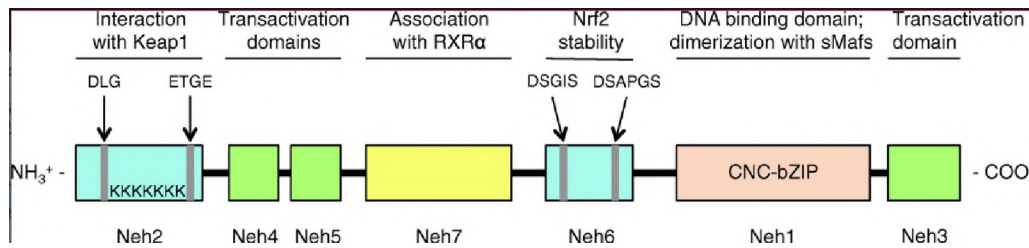
1.2 Nrf2

Ρόλος

Ο ανθρώπινος μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 αντιπροσωπεύει έναν κρίσιμο ρυθμιστή των μηχανισμών άμυνας των κυττάρων έναντι των ξеноβιοτικών ουσιών και του οξειδωτικού στρες. Συντονίζει την επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες ενεργοποίηση μιας μεγάλης κατηγορίας κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται και σε άλλες φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η αυτοφαγία, ο ενδιάμεσος μεταβολισμός, η διατήρηση της κατάστασης ηρεμίας των βλαστοκυττάρων κ.α.

Δομή:

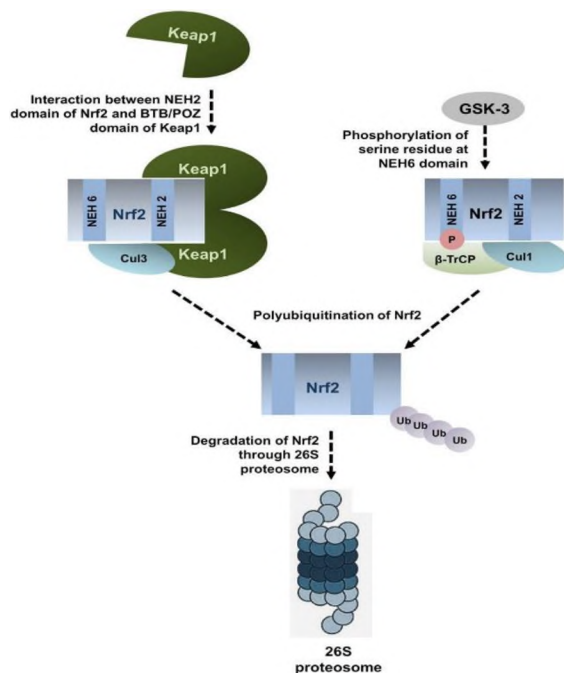
Ο Nrf2 αποτελεί μέλος της υποοικογένειας cap 'n' collar (CNC) των basic leucine Zipper (bZIP) πρωτεϊνών. Αποτελείται από 7 ομόλογους τομείς Nrf2-ECH, καθένας από τους οποίους έχει μια συγκεκριμένη λειτουργία (Bellezza et al., 2018a). Ο ιδιαίτερα συντηρημένος ανάμεσα στα είδη Neh1 διαθέτει μια περιοχή CNC-bZIP, υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με το DNA καθώς και για τον διμερισμό της με τις πρωτεΐνες sMaf (Keum & Choi, 2014). Ο τομέας Neh2 περιέχει δυο συντηρημένες αλληλουχίες, τα μοτίβα DLG και ETGE, μέσω των οποίων ρυθμίζεται από την Keap1 πρωτεΐνη (Tonelli et al., 2018). Στην C- τελική περιοχή εντοπίζεται ο Neh3 τομέας ο οποίος αλληλοεπιδρώντας με τους τομείς Neh4 και Neh5 ρυθμίζει την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του Nrf2 (Tonelli et al., 2018). Τέλος ο τομέας Neh6 είναι μια πλούσια σε σερίνη αλληλουχία η οποία εμπλέκεται στην ανεξάρτητη από την πρωτεΐνη Keap1 ρύθμιση του Nrf2.



Εικόνα 7 Ομόλογοι τομείς του Nrf2 και οι επιμέρους λειτουργίες τους

Αναστολή της λειτουργίας του Nrf2 και αποικοδόμησή του

Υπό φυσιολογικές μη στρεσαρισμένες κυτταρικές συνθήκες μόνο τα βασικά επίπεδα αντιοξειδωτικών γονιδίων απαιτούνται, επομένως ο Nrf2 κατακρατείται στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζεται η είσοδος του στο πυρήνα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δύο μηχανισμών: Ο πρώτος μηχανισμός διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Keap1 ενώ ο δεύτερος από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β). Ο πρώτος εμπλέκεται στις μείζονες οξειδωτικές/ηλεκτρονιόφιλες επιθέσεις, ενώ ο δεύτερος σε μικρές διακυμάνσεις των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα ως συνάρτηση της μεταβολής των απαιτήσεων του κυττάρου (Cuadrado, 2015). Και στις δυο περιπτώσεις ο Nrf2 τροποποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να ουβικιτινιλιωθεί και να αναγνωριστεί από το 26S πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση και μείωση των επιπέδων του.

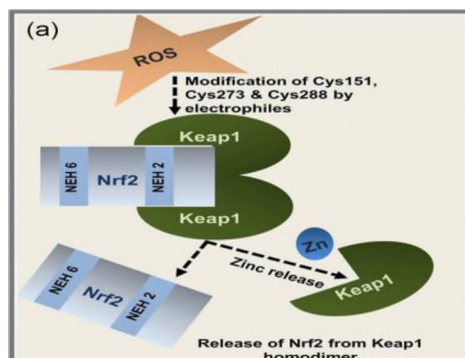


Εικόνα 8 Πρωτεωσωμική αποικοδόμηση του Nrf2

Σταθεροποίηση του Nrf2 και μεταφορά του στο πυρήνα.

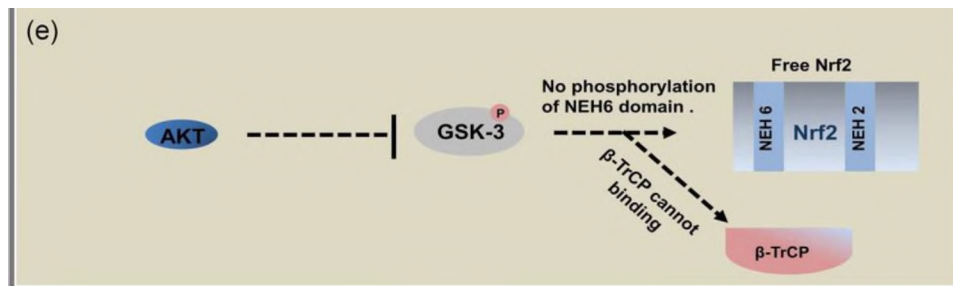
Για να σταθεροποιηθεί ο Nrf2 απαιτείται η αναστολή των αρνητικών ρυθμιστικών μηχανισμών που οδηγούν στην αποικοδόμησή του.

Αναστολή της Keap1: Η πρωτεΐνη Keap 1 μέσω των περιοχών BTB της σχηματίζει ομοδιμερή και συνδέεται μέσω των μοτίβων ETGE και DLG στον τομέα Neh2 του Nrf2. Η έκθεση του κυττάρου σε κάποιο ηλεκτρονιόφιλο ή ROS έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση κρίσιμων υπολειμμάτων κυστεΐνης, της Cys151 της BTB περιοχής και των Cys274 και Cys288 της ενδιάμεσης περιοχής της Keap1 το οποίο οδηγεί σε απελευθέρωση ψευδαργύρου (Zn) και τελικώς την απενεργοποίηση της ουβικιτινίωσης (Cullinan et al., 2004).



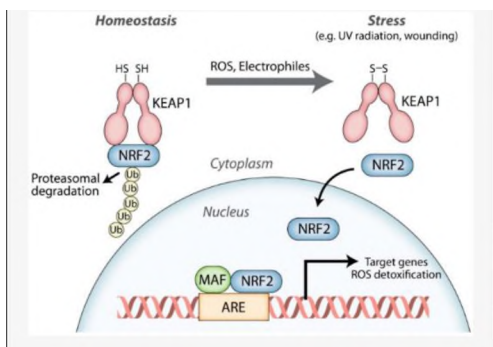
Εικόνα 9 Μηχανισμός αναστολής Nrf2 μέσω της keap1

Αναστολή GSK3β: Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) η οποία φωσφορυλιώνει την GSK3β, την αδρανοποιεί και δεν μπορεί πλέον να φωσφορυλιώσει τον τομέα Neh6 του NRF2, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη προσαρμογέας λιγάση ουβικιτίνης βTrCP να μην μπορεί να προσδεθεί στον μεταγραφικό παράγοντα ώστε να τον οδηγήσει στο πρωτεόσωμα 26S για αποικοδόμηση (Mathur et al., 2018).



Εικόνα 10 Μηχανισμός αναστολής μέσω της GSK3β

Για την μεταφορά του Nrf2 στον πυρήνα σημαντικό ρόλο παίζει το ετεροδιμερές α5-β1 ιμπορτίνης, το οποίο αναγνωρίζει τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού του (NLS) και το μεταφέρει μέσω πυρηνικών πόρων στον πυρήνα (Silva-Islas & Maldonado, 2018). Εκεί συνδέονται με τις μικρές sMaf πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν μια bZIP περιοχή σύνδεσης με τον DNA αλλά στερούνται την ικανότητα να ενεργοποιήσουν την έκφραση γονιδίων όπως κάνουν οι μεγάλες Maf πρωτεΐνες (Motohashi et al., n.d.). Τα διμερή Nrf2- sMaf συνδέονται στις περιοχές ARE των υποκινητών των αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και ελέγχουν την έκφρασή τους (Reddy, n.d.).

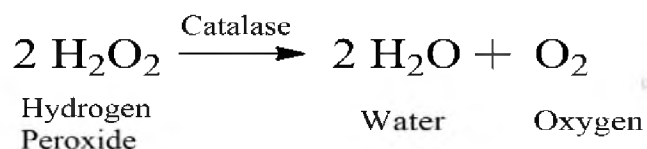


Εικόνα 11 Συνολικό μονοπάτι του NRF2

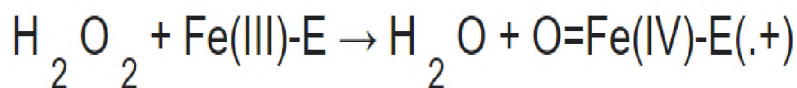
1.3 Ένζυμα-στόχοι του NRF2

1.Καταλάση (cat)

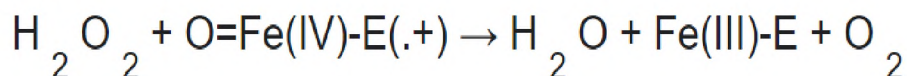
Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων η καθεμία, το οποίο καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2) (Putnam et al., 1999). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρικές ομάδες αίμης, οι οποίες του επιτρέπουν να αντιδρά με το υπόστρωμά του. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα σε μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα και η αντίδραση που καταλύσει είναι η εξής:



Ο μηχανισμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου πραγματοποιείται σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο ο σίδηρος Fe^{3+} της πορφυρικής ομάδας της αίμης ανάγει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό παράγοντας ταυτόχρονα $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ (ένωση 1).



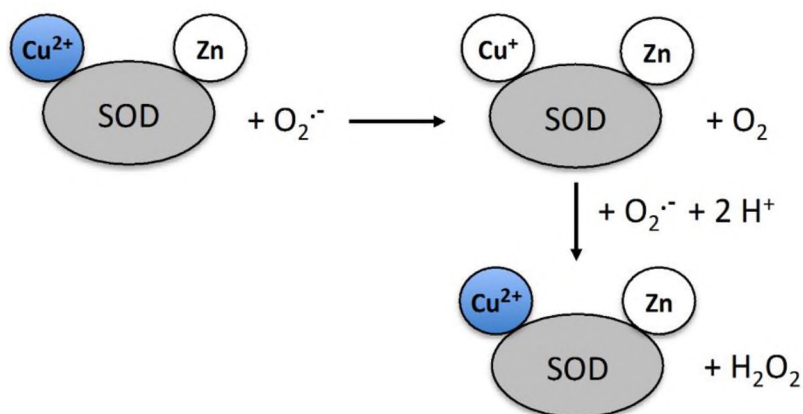
Στο δεύτερο στάδιο το $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ οξειδώνει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο και νερό.



2.Υπεροξειδική δισμουτάση 1 (Sod1)

Ως μέρος της αντιοξειδωτικής άμυνας η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (Sod1) είναι ένα άφθονο και εξαιρετικά διατηρημένο ένζυμο το οποίο καταλύει την μετατροπή του ανιόντος του

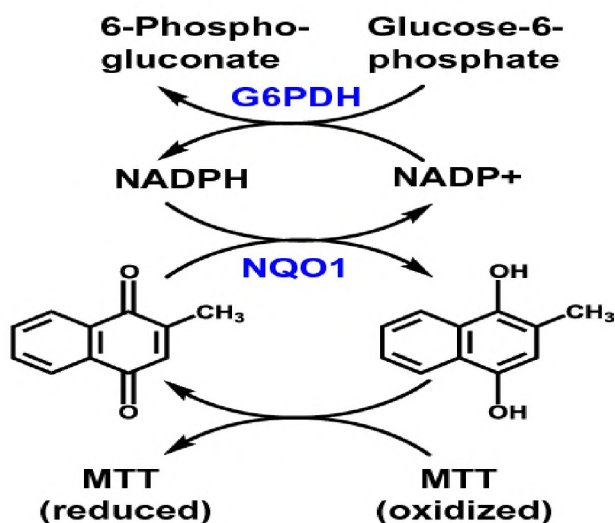
σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και οξυγόνο. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε διμερή μορφή με τις υπομονάδες του να ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμό και καθεμία από αυτές να περιέχει ένα Cu και ένα Zn, δυο μεταλλικά ιόντα με καταλυτικό ρόλο (Sea et al., 2015). Η ενζυμική του δράση αποτελεί μια οξειδοαναγωγική αντίδραση δυο σταδίων, όπου αρχικά το ανιόν του σουπεροξειδίου ανάγεται σε O_2 δεχόμενο ένα ηλεκτρόνιο από τον Cu, ενώ στη συνέχεια το μοριακό οξυγόνο οξειδώνεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (Εικ. 12).



Εικόνα 12 Αποτοξίνωση του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) από την Sod1.

3.NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (NQO1).

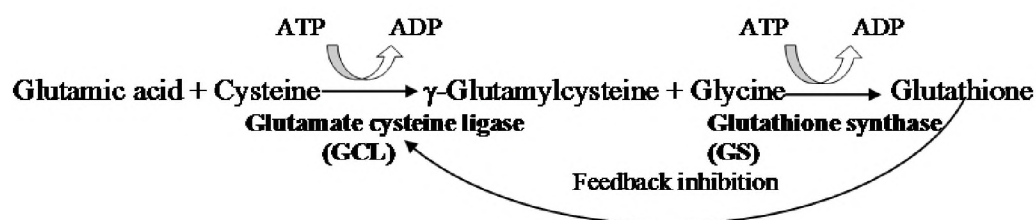
Οι κινόνες αποτελούν μόρια τα οποία παράγονται ύστερα από την αντικατάσταση υδρογόνων από οξυγόνα σε αρωματικές ενώσεις και μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή υπεροξειδίου το υδρογόνου. Η αποτοξίνωση των κινονών καταλύεται από την NAD(P)H αφυδρογονάση των κινονών (NQO1), ένα ομοδιμερές ένζυμο το οποίο χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο το FAD, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NAD(P)H στις κινόνες, μετατρέποντάς τις σε υδροκινόνες, μόρια λιγότερο δραστικά. Συνεπώς, η NQO1 προστατεύει το κύτταρο από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Ross & Siegel, 2021).



Εικόνα 13 Μηχανισμός μετατροπής κινονών σε αδρανείς υδροκινόνες.

4.Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (gclc).

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και συντίθεται στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των κυττάρων από ATP-εξαρτώμενα ένζυμα. Το πρώτο βήμα για την σύνθεση της GSH, το οποίο είναι και το ρυθμοκαθοριστικό βήμα, καταλύεται από τη λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GLC). Το ένζυμο αυτό είναι ετεροδιμερές και αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα (GCLC) και μία ρυθμιστική υπομονάδα (GCLM) (Franklin et al., 2009). Χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα κυστεΐνη και γλουταμινικό, η γ-GCL συνθέτει γ-γλουταμυλοκυστεΐνη, από την οποία με προσθήκη γλυκίνης από την συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) συντίθεται η GSH.

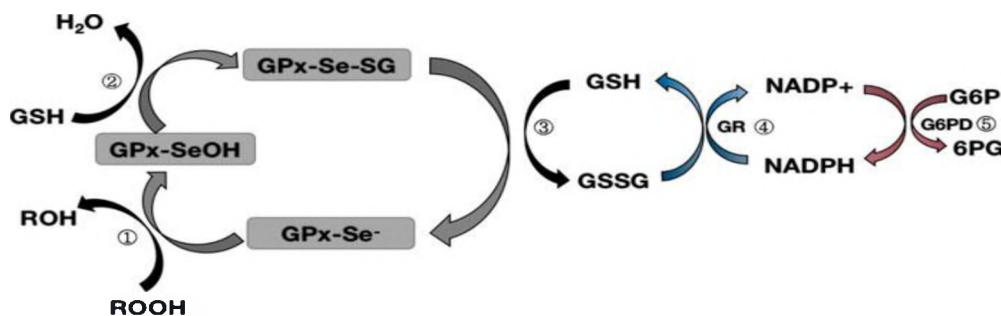


Εικόνα 14 Σύνθεση γλουταθειόνης από γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη

5.Περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (Gpx1)

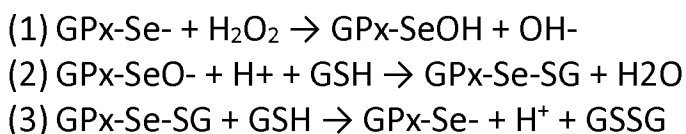
Η περοξειδάση της γλουταθειόνης 1 (Gpx1) είναι ένα τετραμερές ένζυμο, που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια, και το οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε ως ένζυμο ερυθρών αιμοσφαιρίων που προστατεύει την αιμοσφαιρίνη από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι αποτελεί μια σεληνοπρωτεΐνη με μια σεληνοκυστεΐνη (SeC)

στο ενεργό της κέντρο, ικανή να αντιδράσει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ορισμένα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια χαμηλού μοριακού βάρους (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013)



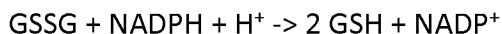
Εικόνα 15 Μηχανισμός δράσης της Gpx1.

Για την αναγωγή του H_2O_2 και των άλλων υποστρωμάτων του σε νερό, η Gpx1 χρησιμοποιεί ως αναγωγικό παράγοντα την GSH. Η αντίδραση που πραγματοποιεί η Gpx1 είναι η εξής:



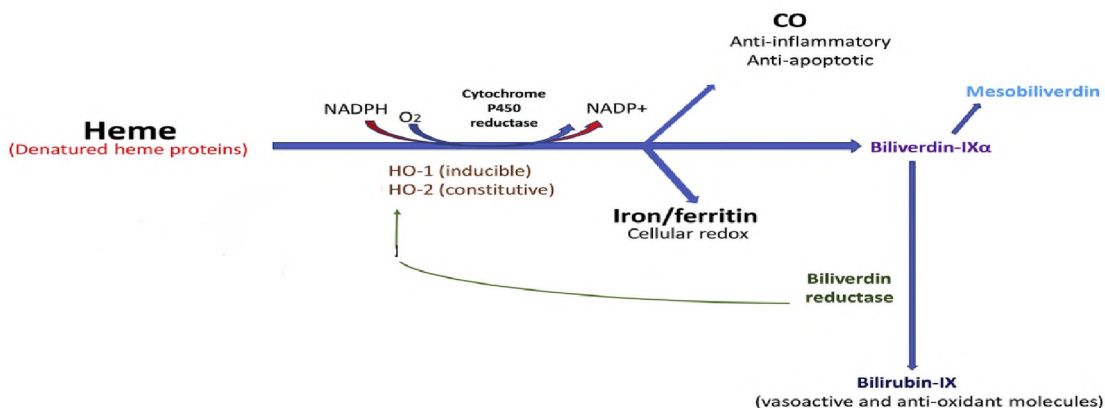
6. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR)

Η γλουταθειόνη (GSH) έχει αναγωγικές ιδιότητες και έτσι μετατρέπεται στην οξειδωμένη μορφή της (GSSH). Η μετατροπή και πάλι της οξειδωμένης γλουταθειόνης στην ανηγμένη μορφή της (GSH) καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR), μια φλαβοπρωτεΐνη απαραίτητη για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (Deronte, 2013). Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:



7. Οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1)

Η οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1) είναι ένα εξαιρετικά ενεργό ένζυμο, το οποίο καταλύει την στερεοειδική διάσπαση της αίμης σε χολοπρασίνη, με την απελευθέρωση σιδήρου (Fe^{2+}) και μονοξειδίου του άνθρακα (CO) (Kikuchi et al., 2005).



Εικόνα 16 Διάσπαση της αίμης από την HO-1.

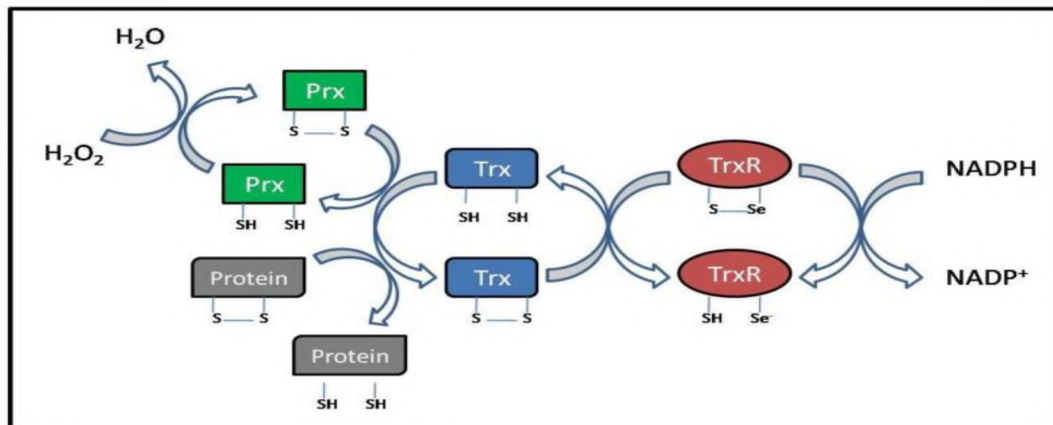
Η HO-1 έχει χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικός μηχανισμός διότι η χολοπρασίνη αλλά και η χολερυθρίνη που παράγεται από την χολοπρασίνη αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά. Το CO αν και είναι ιδιαίτερα τοξικό, σε μικρές συγκεντρώσεις έχει βρεθεί ότι λειτουργεί ως αέριος νευροδιαβιβαστής, ενώ λειτουργεί ταυτόχρονα ως αντι-αποπτωτικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Ο σιδηρός που απελευθερώνεται από την διάσπαση της αίμης συμβάλλει στην δημιουργία προοξειδωτικής κατάστασης στο κύτταρο, ωστόσο η αύξηση της παραγωγής της φερριτίνης οδηγεί σε αποθήκευσή του από αυτήν και μείωση της τοξικότητας του (Morse & Choi, 2005).

8. Θειορεδοξίνη (Txn)

Η θειορεδοξίνη είναι μια αγωγιά, ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας είναι να ανάγει πρωτεΐνες και εκτεθειμένους δισουλφιδικούς δεσμούς μέσω της NADPH .

Η Txn περιέχει στο ενεργό της κέντρο μια συντηρημένη αλληλουχία -Cys-Gly-Pro-Cys-, υπεύθυνη για την δράσης της πρωτεΐνης ως πρωτεϊνική οξειδοαναγωγή. Τα δυο κατάλοιπα κυστεΐνης είναι απαραίτητα για την καταλυτική δραστηριότητα της Txn-1 ενώ τα άλλα δυο ευθύνονται για τις θερμοδυναμικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητές της (Arner & Holmgren, 2000) .

Μηχανισμός: Η δράση της θειορεδοξίνης στηρίζεται στην αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών από την ανηγμένη μορφή της. Η ίδια η Txn οξειδώνεται, ενώ επαναφέρεται στην ανηγμένη της μορφή από την αναγωγή της Txn (TxnR) με τη κατανάλωση NADPH (Karlenius & Tonissen, 2010).



Εικόνα 17 Μηχανισμός δράσης της Trx.

1.4 Τα θαλάσσια μακροφύκη (Macroalgae ή Seaweeds)

Τα θαλάσσια μακροφύκη παίζουν ζωτικό ρόλο στη δομή και την λειτουργία τόσο των παραθαλάσσιων περιοχών όσο και των περιοχών που εκβάλουν οι ποταμοί. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 1.200 είδη μακροφυκών, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο ως πρωτογενείς παραγωγοί στα θαλάσσια οικοσυστήματα, συμβάλλοντας στην παραγωγή σε ποσοστό πάνω από το 40%, της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής οξυγόνου (Healy et al., 2023). Λόγω της πλούσιας περιεκτικότητας τους σε ενώσεις με υψηλή θρεπτική αξία όπως βιταμίνες, ριβοφλαβίνες, πρωτεΐνες, μέταλλα, διαλυτές και αδιάλυτες ίνες και ιχνοστοιχεία έχει παρατηρηθεί ένα έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα θαλάσσια μακροφύκη, κυρίως ως πολύτιμη πηγή στην ανθρώπινης διατροφή.

Τα μακροφύκη διαθέτουν επίσης και διάφορα συστατικά όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και φαιολικές ενώσεις, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες όπως αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές (Healy et al., 2023).

1.4.1 *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux

Το μακροφύκος *Hypnea musciformis* αποτελεί ένα είδος κόκκινου θαλάσσιου μακροφύκου που ανήκει στο φύλο των ροδοφυκών, στην κατηγορία Florideophyceae, της τάξης Gigartinales και της οικογένειας Cystocloniaceae. Εντοπίζεται κυρίως στον Ατλαντικό, τον Ειρηνικό και τον Ινδικό ωκεανό, αλλά και σε μικρότερες θάλασσες όπως είναι η Μεσόγειος θάλασσα. Έχει προκαλέσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των βιοδραστικών ενώσεων που παράγει, όπως είναι οι θειικοί πολυσακχαρίτες (π.χ. καραγενάνες) οι οποίες μεταξύ άλλων εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (Souza et al., 2018). Έχει αποδειχθεί σε διάφορες επιστημονικές μέletes ότι το *H. musciformis* δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδάση, και προστατεύει τις ανθρώπινες λιποπρωτεΐνες μικρής πυκνότητας (LDL) από οξείδωση (T. V. De Brito et al., 2013).



Εικόνα 18 *Hypnea musciformis* J.V. Lamouroux.

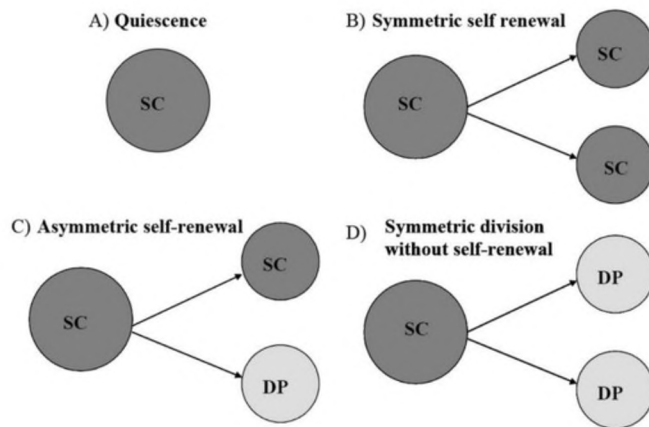
1.4 ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

1.5.1 Τι είναι τα βλαστοκύτταρα.

Τα βλαστοκύτταρα ή βλαστικά κύτταρα (stem cells) είναι ένας πληθυσμός αδιαφοροποίητων κυττάρων που συναντώνται σε πολυκύτταρους οργανισμούς και χαρακτηρίζονται από απεριόριστη ικανότητα αυτό-ανανέωσης καθώς και από τη δυνατότητα διαφοροποίησης προς ένα τουλάχιστον κυτταρικό τύπο (Jones et al., 2010). Οι δύο αυτές ιδιότητες καθιστούν τα βλαστοκύτταρα ικανά να διαιρεθούν με τους εξής τρόπους:

- I. Συμμετρική διαίρεση, κατά την οποία από την κυτταρική διαίρεση προκύπτουν δυο θυγατρικά κύτταρα πανομοιότυπα με το μητρικό (B).
- II. Ασύμμετρη διαίρεση, κατά την οποία προκύπτει ένα θυγατρικό κύτταρο περισσότερο εξειδικευμένο από το μητρικό ενώ το δεύτερο είναι ίδιο με το μητρικό (C).
- III. Συμμετρική διαίρεση χωρίς αυτό-ανανέωση, κατά την οποία τα βλαστοκύτταρα διαιρούνται προς δυο διαφοροποιημένα βλαστοκύτταρα (D).
- IV. Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να διατηρηθούν και σε κατάσταση ηρεμίας όπου ούτε διαιρούνται ούτε διαφοροποιούνται (A).

Οι διαφορετικές πορείες διαίρεσης έχουν και διαφορετικές επιπτώσεις στο απόθεμα των βλαστοκυττάρων και κατά συνέπεια στην διατήρηση της ομοιόστασης. Καταστάσεις όπως η ηρεμία και η ασύμμετρη διαίρεση οδηγούν σε διατήρηση τους, η συμμετρική διαίρεση οδηγεί σε αύξηση τους, ενώ τέλος η συμμετρική διαίρεση χωρίς αυτό-ανανέωση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση τους (Biehl & Russell, 2009a).

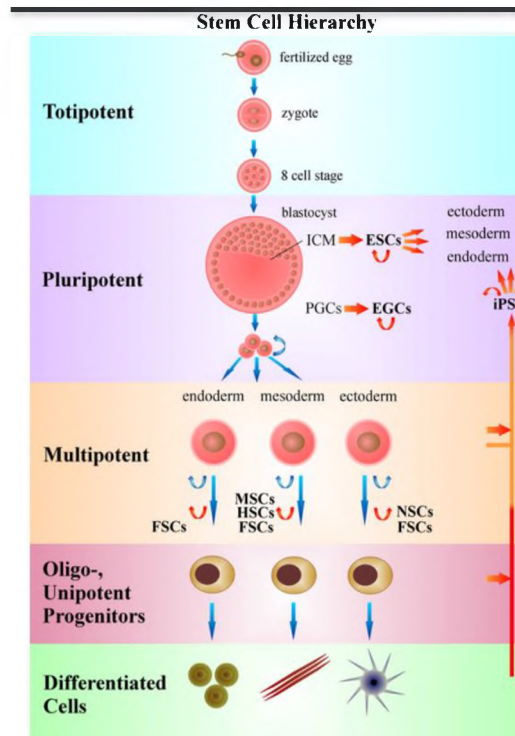


Εικόνα 19 Τρόποι διαίρεσης των βλαστοκυττάρων.

1.5.2 Δυναμικό διαφοροποίησης βλαστοκυττάρων (potency)

Ορίζεται ως η δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων και διαφέρει ανάμεσα στα διαφορετικά είδη. Με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης μπορούμε να κατατάξουμε τα βλαστοκύτταρα σε 5 μεγάλες κατηγορίες:

1. Παντοδύνα (totipotent): Στην κατηγορία αυτή ανήκει το ζυγωτό. Διαθέτουν το υψηλότερο δυναμικό διαφοροποίησης καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και των τριών στοιβάδων της βλαστοκύστης, δηλαδή σε ενδοδερμικά, μεσοδερμικά, και εξωδερμικά κύτταρα, με δυνατότητα σχηματισμού τόσο εμβρυϊκών όσο και εξω-εμβρυϊκών δομών (Chagastelles & Nardi, 2011)
2. Ολοδύναμα (pluripotent): Μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα όλων των βλαστικών στοιβάδων με τη διαφορά ότι δεν σχηματίζουν εξωεμβρυϊκές δομές (de Miguel et al., 2010)
3. Τα πολυδύναμα (multipotent): Διαθέτουν πιο περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης, καθώς διαφοροποιούνται σε κύτταρα μίας μόνο στιβάδας διατηρώντας κυρίως την ομοιότητα των ιστών (Biehl & Russell, 2009b)
4. Ολιγοδύναμα (oligopotent): Αποτελούν κατηγορία βλαστοκυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς δυο ή περισσότερες γενεαλογίες κυττάρων εντός του ίδιου ιστού (Zakrzewski et al., 2019).
5. Μονοδύναμα (unipotent): Αποτελούν ομάδα κυττάρων με δυνατότητα διαφοροποίησης προς έναν μόνο κυτταρικό τύπο εντός ενός ιστού (Biehl & Russell, 2009b).



Εικόνα 20 Ιεραρχία των βλαστοκυττάρων

1.5.3 Βιολογική προέλευση και πηγές βλαστοκυττάρων.

Ανάλογα με την προέλευση τους τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

A) Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESC):

Τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα έχουν τις εξής ιδιότητες:

- Απομονώνονται από ένα πληθυσμό κυττάρων που ονομάζεται εσωτερική κυτταρική μάζα ή αλλιώς εμβρυοβλάστη (ICM) της βλαστοκύστης (Evans & 1981).
- Είναι ολοδύναμα κύτταρα καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα όλων των βλαστικών στοιβάδων.
- Μπορούν να πολλαπλασιάζονται ασταμάτητα in vitro διατηρώντας τη χρωμοσωμική τους σταθερότητα ακόμα και σε πολύ προχωρημένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων.
- Η χρήση τους εγείρει ηθικούς φραγμούς ως προς την πορεία διαφοροποίησής τους (Lin, 2011).

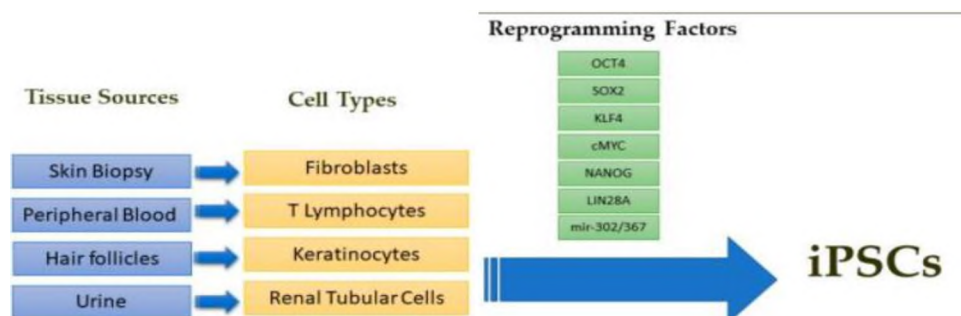
B) Ενήλικα βλαστοκύτταρα (ASCs).

Τα Ενήλικα ή Σωματικά βλαστοκύτταρα (ASCs) είναι αδιαφοροποίητο κύτταρα (Zakrzewski et al., 2019) που βρίσκονται εντός δομών που ονομάζονται 'φωλεές' ή 'εσοχές' (niches) σε όλους σχεδόν τους ιστούς των οργανισμών, οι οποίες δομές εξασφαλίζουν τη ρύθμιση της αύξησης και ανάπτυξης των βλαστοκυττάρων. Κύριος ρόλος τους είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού μέσω της επούλωσης, αύξησης και ανανέωσης των κατεστραμμένων/τραυματισμένων

κυττάρων. Εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, όπως στον μυελό των ιστών (bone marrow) που αποτελεί πηγή μεσεγχυματικών και αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells), στο λιπώδη ιστό (adipose-derived stem cells) και τους επιθηλιακούς ιστούς (epithelial-derived stem cells) (Al-Himdani et al., 2017). Επίσης εντοπίζονται στο αίμα, στο έντερο, στο δέρμα, στους μυς, στον εγκέφαλο και στην καρδιά. Είναι κύτταρα με περιορισμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης και μπορεί να είναι πολυδύναμα, μονοδύναμα ή ολοδύναμα. Τέλος η χρήση τους δεν εγείρει ηθικά ζητήματα, όπως στην περίπτωση των εμβρυικών βλαστοκυττάρων (Chagastelles & Nardi, 2011).

Γ) Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs)

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (Perinatal Stem Cells) προέρχονται από σωματικά κύτταρα και αναπτύσσονται με επαναπρογραμματισμό προς ολοδύναμα βλαστοκύτταρα μέσω της επαγωγής της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παραγόντες. Διαθέτουν δυνατότητα απεριόριστης διαίρεσης *in vitro* και ικανότητα διαφοροποίησης προς όλους τους ώριμους κυτταρικούς τύπους ενός οργανισμού, με αποτέλεσμα να δίνουν τη δυνατότητα μεταμόσχευσης χωρίς ανοσολογική απόκριση, ενώ η χρήση τους στην έρευνα δεν εγείρει ηθικά ζητήματα (Ilic & Polak, 2011).



Εικόνα 21 Πηγές προέλευσης επαγόμενων ολοδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs).

Δ) Περιγεννητικά βλαστοκύτταρα

Τέλος τα περιγεννητικά βλαστοκύτταρα (Perinatal Stem Cells) αποτελούν μια κατηγορία κυττάρων που απομονώνονται από το αίμα ή τον ιστό του ομφάλιου λώρου, το αμνιακό υγρό και από τον πλακούντα, γεγονός το οποίο καθιστά τη συλλογή τους εύκολη και χωρίς κινδύνους. Είναι πολυδύναμα κύτταρα ωστόσο δεν έχουν την δυνατότητα απεριόριστων διαιρέσεων *in vitro* (Ilic & Polak, 2011). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα της γέλης του Wharton.

1.5.4. Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (MSCs)

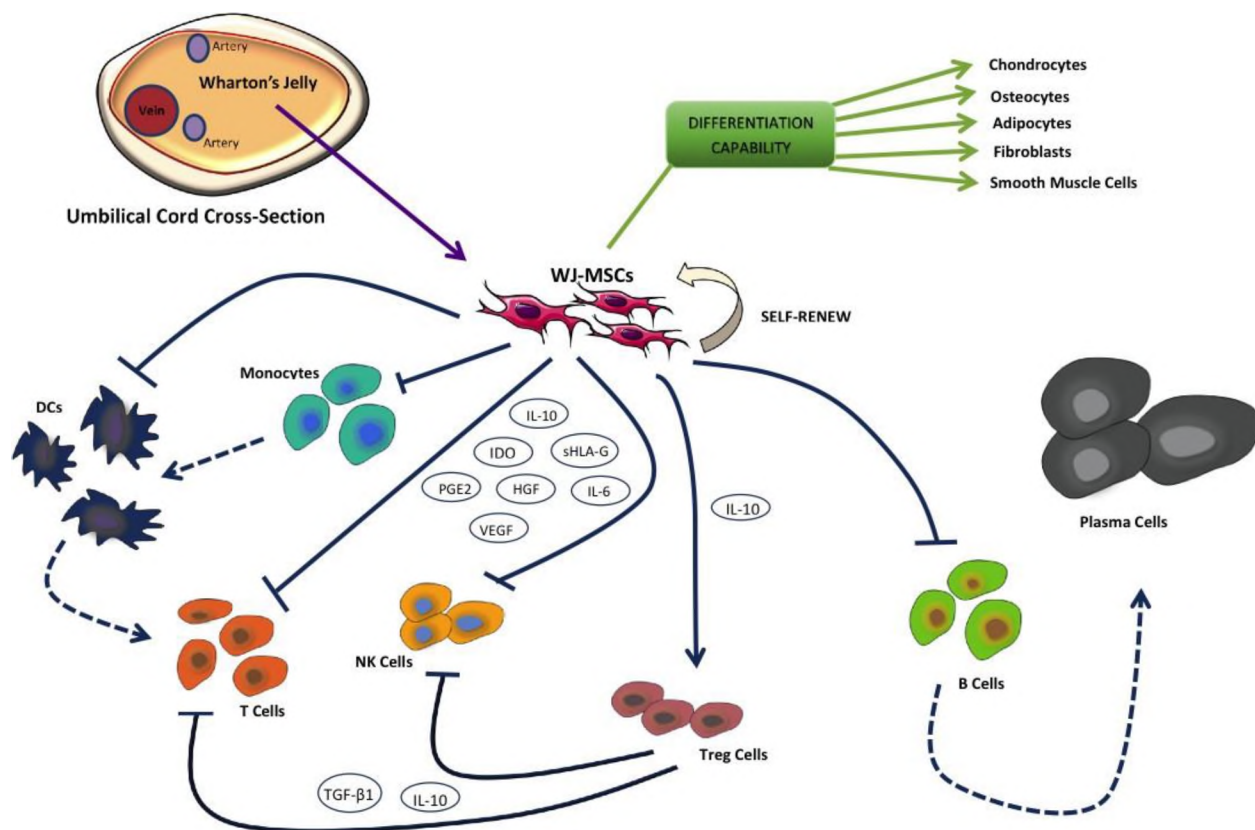
Τα μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (MSCs) ή Στρωματικά κύτταρα (Stromal cells) είναι πολυδύναμα (multipotent) κύτταρα με δυνατότητα αυτο-ανανέωσης, ικανά να διαφοροποιούνται σε πολλαπλές μεσεγχυματικές γενεαλογίες όπως λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και αιμοποιητικά κύτταρα (Friedenstein et al., 1987). Παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Friedenstein ο οποίος απέδειξε την ύπαρξη ενός μη-αιμοποιητικού πληθυσμού κυττάρων με ατρακτοειδές σχήμα παρόμοιο με αυτό των ινοβλαστών, τα οποία είχαν απομονωθεί από τον μυελό των οστών. Μπορούν να συλλεχθούν από διάφορους ιστούς όπως μυελό των οστών, σκελετικούς μύες, λιπώδη ιστό, ομφάλιο λώρο, αρθρικό υμένα, φωνητικές χορδές, αμνιακό υγρό καθώς και από τους πνεύμονες και την καρδιά.

Ανάλογα με την προέλευση τους διακρίνονται σε Ενήλικα τα οποία απομονώνονται από ενήλικους ιστούς όπως ο μυελός των οστών (BM-MSCs) ή τον λιπώδη ιστό (AD-MSCs), και σε Εμβρυικά /Περηνγεννητικά βλαστοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από το ίδιο το έμβρυο καθώς και από εξωεμβρυικές δομές όπως ο ομφάλιος λώρος (π.χ. τα MSCs της γέλης του Wharton ή WJ-MSCs) και από την αμνιακή μεμβράνη. Ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης των MSCs, η μελέτη τους βρίσκεται στο επίκεντρο της αναγεννητικής ιατρικής με σκοπό την αναγέννηση/αποκατάσταση τραυματισμένων ιστών καθώς και στη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Le Blanc et al., 2008)

Σε αντίθεση με τα αιμοποιητικά και επιθηλιακά κύτταρα τα οποία στην επιφάνεια τους εκφράζουν τους κυτταρικούς δείκτες CD34, CD45, CD11b, CD19 CD79a, CD80, και HLA-class II, τα MSCs εκφράζουν τους δείκτες CD90, CD100, CD44, CD73, CD9 και μικρή ποσότητα CD80 (CD: Cluster of Differentiation).

1.5.5 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από την γέλη του Wharton(WJ-MSCs)

Η γέλη του Wharton αποτελεί τον βλεννώδη συνδετικό ιστό που βρίσκεται στο εσωτερικό μέρος του αμνιακού επιθηλίου και προβάλλει στον ομφάλιο λώρο. Τα MSCs που απομονώνονται από τη γέλη του Wharton χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα με ικανότητα διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Ιδιότητες τους όπως το μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης, η ευκολία συλλογής τους αλλά και οι ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες, τους δίνουν σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων τύπων μεσεγχυματικών κυττάρων (Karahuseyinoglu et al., 2007). Τέλος έχει βρεθεί ότι εκφράζουν δείκτες στην επιφάνεια τους που τους παρέχουν ικανότητα ρύθμισης της ανοχής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα να αποτελούν ένα υποσχόμενο εργαλείο για την αναγεννητική ιατρική.



Εικόνα 22 Δυναμικό διαφοροποίησης μεσεγχυματικών θλαστοκυττάρων προερχόμενα από την γέλη Whatson (WJ-MSCS).

2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος από το θαλάσσιο μακροφύκος *Hypnea musciformis* το οποίο απομονώθηκε από το Αιγαίο Πέλαγος σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Σε πρώτο στάδιο αξιολογήθηκαν και μετρήθηκαν οι αλλαγές που επιφέρει στους οξειδωτικούς δείκτες TBARS, CARB και TAC, GSH και ROS η επίδραση με το εκχύλισμα παρουσία ή/και απουσία οξειδωτικού στρες επαγόμενου από H_2O_2 στα κύτταρα. Επίσης εξετάστηκε η προστασία του εκχυλίσματος από βλάβες στο DNA που επάγονται από οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Ακολούθως εξετάστηκε η επίδρασή του εκχυλίσματος στα πρωτεϊνικά και μεταγραφικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 καθώς και η ενεργοποίησή του. Τέλος προσδιορίστηκε η επίδρασή του εκχυλίσματος στα πρωτεϊνικά και μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων στόχων του Nrf2.

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Εκχύλισμα

Η συλλογή και η εκχύλιση του *Hypnea musciformis* (HME) είχε γίνει σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας .(Begolli et al., 2023).

3.2 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Τα κύτταρα αυτά είναι ιδανικά για καλλιέργεια καθώς εμφανίζουν μικρότερο χρόνο αναδιπλασιασμού του πληθυσμού τους (Population Doubling) σε σχέση με τα άλλα κύτταρα (Karahuseyinoglu et al., 2007), ενώ ταυτόχρονα ωφελούνται από την επαφή τους με γειτονικά κύτταρα στην καλλιέργεια. Χαρακτηρίζονται επίσης ως κύτταρα ‘adherent’, δηλαδή προσκολλώνται στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας τους. Ωστόσο, εάν αυξηθεί κατά πολύ η συγκέντρωσή τους τότε παρατηρείται το φαινόμενο του ‘contact inhibition’, δηλαδή της έκκρισης παραγόντων επιβλαβών για τον πολλαπλασιαστικό δυναμικό των γειτονικών κυττάρων (Karahuseyinoglu et al., 2007). Άρα με την κάλυψη του 80% της επιφάνειας του μέσου καλλιέργειας (confluency) είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων ώστε να έχουν τον απαραίτητο χώρο και τις ιδανικές συνθήκες για να αναπτυχθούν. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης, τον εύκολο τρόπο απομόνωσης και την δυνατότητα συλλογής τους σε μεγάλες ποσότητες χωρίς να τραυματίσουν τον δότη καθιστούν τα WJ-MSCs ιδανικά κυτταρικό μοντέλο για τον σκοπό αυτής της μελέτης.

Υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες

A. Θρεπτικό μέσο

Για την καλλιέργεια των WJ-MSCs ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco’s Modified Eagle Medium της εταιρείας Biowest (DMEM, BioWest). Είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλων των απαραίτητων αναπτυξιακών παραγόντων στο μέσο καλλιέργειας για αυτό και προστίθεται ορός εμβρύου βοός σε τελική συγκέντρωση 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco). Προστίθενται επίσης τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε αναλογία 1% v/v για τη αποφυγή μολύνσεων του θρεπτικού.

B.Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS, pH 7,4)

Χρησιμοποιήθηκε για τις πλύσεις των κυττάρων.

Γ.Θρυψίνη

Η θρυψίνη αποτελεί ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των καλλιεργούμενων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειάς τους.

Συνθήκες Καλλιέργειας

Για την διαχείριση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θάλαμος καθέτου νηματικής ροής τάξης II, ο οποίος εξασφαλίζει μέσω της UV ακτινοβολίας και του φιλτραρισμένου αέρα στείρες συνθήκες ανάπτυξης. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε φλάσκες πολυστυρενίου οι οποίες διαθέτουν ειδικό φίλτρο ώστε να είναι δυνατή η παροχή οξυγόνου στα κύτταρα χωρίς παράλληλα να επιμολύνονται. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσα σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37° C, επαρκή υγρασία και 5% CO₂. Η κατάσταση ανάπτυξης των κυττάρων παρατηρούνταν με οπτικό ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μέσου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων (15-40).

3.3 Επιδράσεις στα μεσεγχυματικά καλλιεργούμενα κύτταρα με το HME

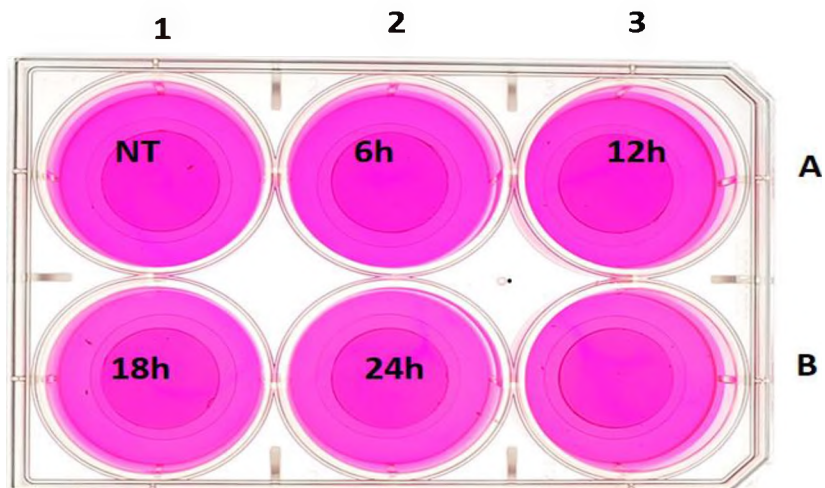
Για την αξιολόγηση της επίδρασης του HME στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των WJ-MSCs, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φλάσκες 75 cm² σε DMEM που περιείχε 10% FBS. Μετά από 24 ώρες επώαση στους 37 °C σε 5% CO₂, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαφορετικές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις HME (25, 50, 75 και 100 µg/ml) σε DMEM, 10% FBS και επώαστηκαν ξανά για 24 ώρες. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας είχε βρεθεί ότι οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του HME ήταν μη κυτταροτοξικές. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των επιπέδων GSH και της οξειδωσής των πρωτεϊνών.

Για την αξιολόγηση της ικανότητας του HME να προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, μετά από 24 ώρες επώασης των WJ-MSCs με HME, το μέσο καλλιέργειας αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 400µM H₂O₂ σε DMEM χωρίς FBS για 30 λεπτά.

Τα συνολικά επίπεδα ROS και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκαν επίσης στα WJ-MSC. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αν και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με HME (100µg/mL) και/ή H₂O₂ όπως περιγράφεται παραπάνω, επιστρώθηκαν σε τριβλία 6 θέσεων (2 X 10⁵ κύτταρα ανά θέση).

Για την επίδραση του HME στην μεταγραφική και μεταφραστική έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων των WJ-MSCs με qRT-PCR και Western blot ανάλυση αντίστοιχα, οι επιδράσεις με το HME (100µg/mL) για 6h, 12h, 18h και 24h έγιναν σε 6-well plates όπου είχε ήδη γίνει επιστροφή των κυττάρων και ανάπτυξη για 24h (Εικόνα 3.1). Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί επεξεργασία (NT: no treatment). Συγκεκριμένα, αρχικά επιστρώνουμε τα κύτταρα στα 6-well plates τα αφήνουμε να αναπτυχθούν για 24h μέχρι η κάλυψη σε κάθε θέση να φτάσει το 80-90%. Διαλύουμε το εκχύλισμα σε θρεπτικό μέσο σε συγκέντρωση 100µg/ml. Στη συνέχεια αφαιρούμε το θρεπτικό από τα 6-well plates,

ξεπλύνουμε με 2ml PBS και αφού αφαιρέσουμε το διάλυμα πλύσης προσθέτουμε 2ml νέο θρεπτικό με την ουσία σε κάθε θέση εκτός του πρώτου το οποίο αντιστοιχεί στο NT. Το θρεπτικό σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ώστε τελικά τα θρεπτικά να αφαιρεθούν όλα μαζί και να ακολουθήσει η απομόνωση πρωτεϊνών ή RNA (Εικόνα 3.1).



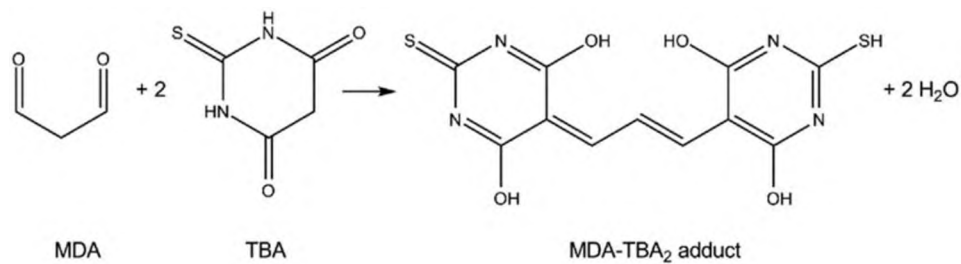
Εικόνα 3.1. Επίστρωση των WJ-MSC σε 6-well plates και επίδραση με το HME για τις μεθόδους qRT-PCR και Western blot ανάλυση.

3.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

3.4.1 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Αρχή μεθόδου

Αποτέλεσμα της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα είναι ο σχηματισμός άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Από την διάσπαση αυτών των ασταθών μορίων παράγεται η μαλονδιαλδεΐδη. Η ποσότητα της μαλονδιαλδεΐδης μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αλληλεπίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS, εκφράζονται ως ισοδύναμα μαλονδιαλδεΐδης, καθώς η ένωση που προκύπτει από την αντίδραση, χαρακτηρίζεται από αναλογία μαλονδιαλδεΐδης:θειοβαρβιτουρικού οξέος 1:2. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μαλονδιαλδεΐδης πραγματοποιείται φωτομετρικά και αποσκοπεί στον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Πειραματική διαδικασία

Ύστερα από επίδραση με HME ή/και H₂O₂ τα κύτταρα ανασηκώθηκαν με θρυψίνη, αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ακολούθησε ανάδευσή τους με vortex. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε με την μέθοδο Brandford. Πραγματοποιήσαμε την αντίδραση σε Falcon (15ml) στα οποία περιέχονται (400-X) ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS όπου το X αντιπροσωπεύει την ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που απαιτείται για να επιτύχουμε 30 mg πρωτεΐνης) ή 400 ml για τα τυφλά και αναμείχθηκαν με 500ml Tris-HCl (200mM, pH 7.4) και 500μL TCA 35% και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρασμα των 45 λεπτών τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο για 10 λεπτά και προστέθηκε στη συνέχεια TCA 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times B / C_{\delta}$$

A_δ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A₀: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

Τιμή 0,156: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μηλονικής διαλδεΐδης.

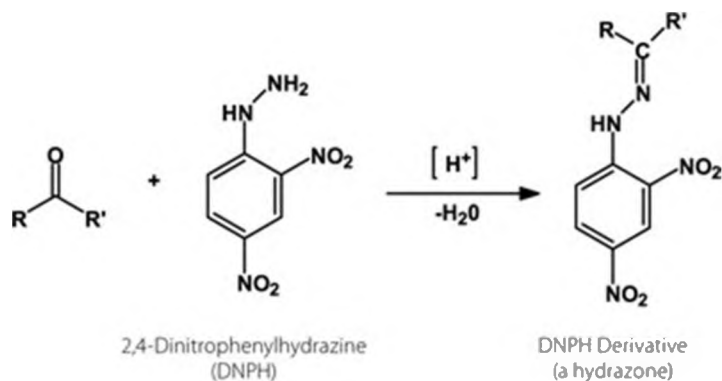
B : Τα μl του κυτταρικού αιωρήματος που χρησιμοποιήθηκαν.

C_δ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford

3.4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS)

Αρχή μεθόδου

Για την οξείδωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται ο δείκτης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Οι καρβονυλικές ομάδες δημιουργούνται στις προσθετικές ομάδες της προλίνης, της λυσίνης, της θρεονίνης και της αργινίνης. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια μη αναστρέψιμη βλάβη η οποία οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας τους. Ταυτόχρονα καρβονυλίωση μπορεί να υποστούν και ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA ή οι DNA πολυμεράσες με αποτέλεσμα οι βλάβες του DNA να μην επιδιορθώνονται και η αντιγραφή να μην είναι απόλυτα ακριβής. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων ανιχνεύεται με την αντίδραση τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).



Πειραματική διαδικασία

Υπολογίστηκε η ποσότητα πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε Eppendorfs 1,5ml. Συγκεκριμένα αφού ανασηκώθηκαν τα κύτταρα με θρυψίνη, έγινε ομογενοποίηση του κυτταρικού αιωρήματος με vortex ενώ διατηρούνταν σε πάγο. Στη συνέχεια σε 200μL κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν 200μL TCA 20% και το μείγμα διατηρήθηκε για 15 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 15,000 στροφές για 5 λεπτά στους 4° C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500μL DNPH 10mM (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) ενώ στα 'τυφλά' προστίθενται 500μL 2,5 N HCL και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 1 ώρα με ανάδευση σε vortex κάθε 15 λεπτά, ενώ στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 15,000 στροφές για 5 λεπτά στους 4° C. Ύστερα αφαιρέθηκε ξανά το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml 10% TCA και έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 mL μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) και έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Τέλος αφαιρείται το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml 5M ουρίας (pH 2,3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15min. Φυγοκεντρούμε στις 15,000 στροφές για 3 λεπτά στους 4° C, και το υπερκείμενο που προκύπτει μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία όπου και μετράμε την απορρόφηση στα 375nm. Κάθε δείγμα περιέχει τουλάχιστον 30μg πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0.022] * 1000 / C_d.$$

Abs_{sample}: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Abs_{blank}: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος Ντελ.αντίδρασης/ μL πλάσματος [1000 μL / 200 μL]).

C_d: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford

3.4.3 Προσδιορισμός των επιπέδων GSH

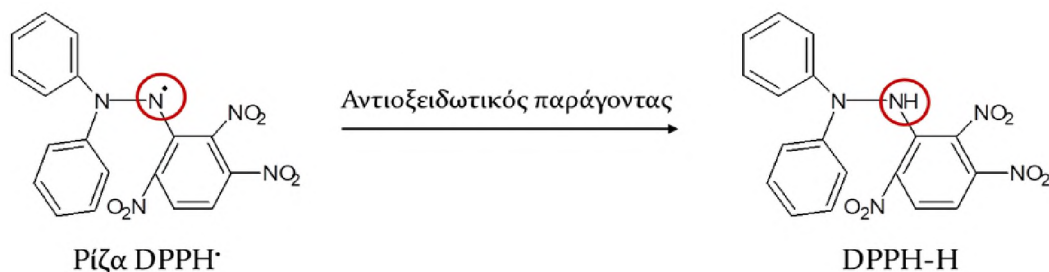
Αρχικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 1 mL, το οποίο συμπεριλάμβανε 520 μL ρυθμιστικού

διαλύματος φωσφορικών νατρίου (67 mM, pH = 8.0), 150 μl κυτταρικού αιωρήματος το οποίο περιείχε 30 μg πρωτεΐνης, και 330 μL διαλύματος DTNB 1 mM. Τα δείγματα αναδεύτηκαν καλά και επωάστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης του υπερκειμένου στα 412 nm. Η συγκέντρωση της GSH υπολογίστηκε στη συνέχεια ως μmol του συντελεστή απόσβεσης της DNTP και εκφραζόμενο nmol GSH ανά mg πρωτεΐνης στο προϊόν λύσης κυττάρων. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

3.4.4 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή μεθόδου

Με τον όρο ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφερόμαστε στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος και των ιστών να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των συστατικών του δείγματος με την ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η παρουσία ενός ατόμου υδρογόνου ανάγει τη ρίζα DPPH• στην αντίστοιχη υδραζίνη. Η υδραζίνη που σχηματίζεται υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520nm.



Πειραματική διαδικασία

Υπολογίζουμε αρχικά με την μέθοδο Brandford τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κυτταρικού εναιωρήματος. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 1 mL, το οποίο συμπεριλάμβανε 50 μL κυτταρικού αιωρήματος με 30μg πρωτεΐνης, 450 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (pH 7,4, 10mM) και 500μl διαλύματος ρίζας DPPH• 0,1mM (50μM τελική συγκέντρωση ρίζας). Τα τυφλά δείγματα περιείχαν μόνο διάλυμα ρίζας DPPH• το οποίο είχε διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4, 10mM). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 20,000 στροφές για 3 λεπτά στους 4° C και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του υπερκειμένου στα 517nm. Το πείραμα επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Υπολογισμοί

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως τα μmol της ρίζας DPPH• που ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταροπλάσματικού αιωρήματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος και υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο (η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα).

$$\text{TAC } (\mu\text{molDPPH}^* / \text{mg πρωτεΐνης}) = [((A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}) \times 0,05 \times 20] / C_{\delta}$$

A_{blank} : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_{sample} : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Τιμή 0,05: Η συγκέντρωση $\mu\text{mol} / \text{ml}$ ρίζας DPPH• στην αντίδραση.

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/ μl αιωρήματος [1000 μl /20 μl]).

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.5 Ανοσοφθορισμός για την εκτίμηση των επιπέδων ROS

Τα κύτταρα στα οποία έγιναν επιδράσεις με το εκχύλισμα HME ή/και με H_2O_2 χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των επιπέδων ROS μέσω μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού.

Ανίχνευση των συνολικών επιπέδων ROS.

A. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

- Διάλυμα πλύσης PBS.
- Διάλυμα θρεπτικού με πυοκυανίνη 200mM (ROS inducer Pyocyanin-PYO).
- Πράσινη φθορίζουσα χρωστική από το Detection Kit (ENZ-51010, ENZO, ΗΠΑ).

B. Διαδικασία που ακολουθήθηκε.

- Αφαίρεση θρεπτικού από το 6-well plate στο οποίο υπάρχουν οι καλυπτρίδες με τα ζωντανά κύτταρα.
- Ξέπλυμα με 2ml PBS.
- Προσθήκη του σκέτου θρεπτικού μέσου με την πυομυκίνη στο NT προκειμένου να λειτουργήσει ως θετικό δείγμα.
- Επώαση για 30 λεπτά στον κλίβανο.
- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και του θρεπτικού με την PYO.
- Προσθήκη της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού όπου η ένταση του χρώματος αντιπροσωπεύει τα επίπεδα των ROS.

3.6 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

3.6.1 Απομόνωση RNA

Υλικά απομόνωσης RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήσαμε τα παρακάτω υλικά;

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)

- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)

Διαδικασία απομόνωσης RNA

Αρχικά απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα και ξεπλένουμε τα κύτταρα με 5ml διάλυμα πλύσης PBS. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1ml θρυψίνη και επωάζουμε για 2-3 λεπτά στον κλίβανο. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα (αν όχι χρησιμοποιούμε scraper) και προσθέτουμε 5ml νέου θρεπτικού στη φλάσκα. Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon 15ml και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 5ml PBS. Ξαναφυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις ίδιες συνθήκες όπως και πριν. Ανάλογα το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων προσθέτουμε 1-3 ml Trizol, και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 15-30° C στο υδατόλουτρο.

Μετά την επώαση προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφορμίου για κάθε 1ml Trizol και αναδεύουμε με vortex για 15 δευτερόλεπτα. Φυγοκεντρούμε στην συνέχεια στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4° C και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε eppendorf των 2ml. Τα τελικά βήματα της διαδικασίας είναι κατά σειρά:

- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4° C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης.
- Ανάδευση με και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4° C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα στον κλίβανο, μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη.
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl).
- Επώαση για 10 λεπτά στους 57° C στο υδατόλουτρο.
- Αποθήκευση του στους -80° C.

3.6.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA(cDNA)

Μετά την απομόνωση του RNA θα πρέπει μέσω της αντίστροφης μεταγραφής *in vitro* να μετατραπεί στο συμπληρωματικό του DNA (cDNA). Χρησιμοποιούνται εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers). Για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν:

- Random hexmers (2,97 μg/μl, Invitrogen).
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen).
- Kit αντίστροφης μεταγραφής SuperScript III (200U/μl, Invitrogen).
- Δις απεσταγμένο νερό ddH₂O.

Πρωτόκολλο σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 3 μl RNA από κάθε δείγμα και η διαδικασία περιλαμβάνει δυο στάδια. Αρχικά διαλύεται το RNA σε ddH₂O με ταυτόχρονη προσθήκη 1μl Random Primers μέχρι τελικού όγκου 15μl και στην θερμαίνουμε τα δείγματα στους 65° C για λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των δευτερογενών δομών των μορίων RNA. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής αναλογίες:

- 4μl Ρυθμιστικό διάλυμα 5x
- 2μl dNTPs
- 2μl χλωριούχο μαγνήσιο
- 2μl DTT
- 0,5μl SuperScript III

Στη συνέχεια ακολούθησε το εξής πρόγραμμα αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR):

- 37° C, 10 λεπτά
- 25° C, 10 λεπτά
- 37° C, 50 λεπτά
- 70° C, 15 λεπτά
- 40° C, τελική θερμοκρασία

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η απομόνωση του RNA ήταν επιτυχημένη και ότι υπάρχει επαρκής ποσότητα, αλλά και για να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα πραγματοποιούμε ενίσχυση των αλληλουχιών ενός γονιδίου αναφοράς, GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), δηλαδή ενός γονιδίου που με συνεχή έκφραση στον υπό μελέτη ιστό. Στη συνέχεια για το cDNA κάθε δείγματος πραγματοποιούμε PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών για το GAPDH.

Primers GAPDH

Forward: -5 GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3-

Reverse: -5 GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3-

Το διάλυμα της αντίδρασης (AmpliTa^q Gold 360 Master Mix) της εταιρίας Applied Biosystems για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

- cDNA 3μl
- ρυθμιστικό διάλυμα 2x 12,5μl
- Εκκινητής F (50p/mol) 1μl
- Εκκινητής R (50p/mol) 1μl
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) 7,5μl

Το πρόγραμμα με τις συνθήκες PCR που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

- Αποδιάταξη στους 95° C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι με τα εξής στάδια ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου:
 - (1) Αποδιάταξη στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα
 - (2) Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στους 60° C για 30 δευτερόλεπτα
 - (3) Επιμήκυνση στους 72° C για 1 λεπτό
 - (4) Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 7 λεπτά

Τέλος για να ελέγξουμε την παρουσία ή μη του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp (Fermentas).

3.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερής πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αξιόπιστη ανίχνευση και παράλληλα μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR (Polymerase Chain Reaction) για κάθε κύκλο τα οποία αντιστοιχούν στο ποσοστό του μητρικού DNA καθώς σε κάθε κύκλο το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται. Η λογική της real time PCR είναι ίδια με αυτήν της PCR όπου μέσω του ενζύμου Taq πολυμεράσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και με την χρήση κατάλληλων ενισχυτών πραγματοποιείται ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.

Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ABI 7300 της εταιρίας Applied Biosystems η οποία στηρίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού των φθορίζουσών χημικών ουσιών που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος που ανιχνεύεται. Ο υπολογισμός της αρχικής ποσότητας DNA στην real time μπορεί να γίνει με 2 τρόπους:

- Ο απόλυτος προσδιορισμός υπολογίζει με ακρίβεια τα αντίγραφα που υπάρχουν πριν την ενίσχυση στο δείγμα για το υπό μελέτη γονίδιο.
- Ο σχετικός προσδιορισμός υπολογίζει την ποσότητα των αντιγράφων σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς.

Εφαρμόσαμε τον σχετικό προσδιορισμό και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήσαμε το GAPDH.
Υλικά για την real time PCR

- cDNA
- ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για τα υπό μελέτη γονίδια
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (DEMO)

Πρωτόκολλο και διάλυμα της αντίδρασης για την real time PCR

Το διάλυμα της αντίδρασης (PCR mix) περιείχε:

- cDNA 3μl
- SYBR Green 7,5μl
- Εκκινητής Forward 0,3μl
- Εκκινητής Reverse 0,3μl
- ddH₂O 3,9μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

ENZYMO	Forward primers	Reverse primers
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3
CAT	5'-CCAGAAGAAGCGGTCAAGAA-3'	5'-TGGATGTGGCTCCCGTAGTC-3'
SOD1	5'-ATGGACCAGTGAAGGTGTTGG-3'	5'-AGTCTCCAACATGCCTCTCTTC-3'

TXN	5'-AGCCTTTCATTCCCTCTC-3'	5'-TCACACTCTGAAGCAACATCCTG-3'
NRF2	5'-ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA-3'	5'-ACTGCTCTTTGGACATCATTTTCG-3'
NQO1	5'-GGGCAAGTCCATCCCAACTG-3'	5'-GCAAGTCAGGGAAGCCTGGA-3'
GCLC	5'-AGCACCTCGCTTCAGTACC-3'	5'-CAATTGCCCATTCCAAATCCCAT-3'
GSH	5'- CCAGCTTAGGAATAACCAGCGATGG- 3'	5'-GTCTTTTAAACCTCCTTGACCTGGGAGAAC- 3'
GPX1	5'-CGCTTCCAGACCATTGACATC-3'	5'-CGAGGTGGTATTTTCTGTAAGATCA-3'
HMOX1	5'-TCTACCGCTCCCGCATGAAC-3'	5'-GCAACTCCTCAAAGAGCTGGATGT-3'

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση του cDNA ήταν η εξής:

- Αποδιάτουμε στους 95° C
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
 - Αποδιάταξη στους 95° C για 15 δευτερόλεπτα
 - Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60° C για 60 δευτερόλεπτα
 - Επιμήκυνση στους 72° C για 30 δευτερόλεπτα
- Επιμήκυνση στους 72° C για 10 λεπτά.

Τελική ανάλυση αποτελεί η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την οποία χρησιμοποιήσαμε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS.22 και η δοκιμασίες independent-samples T-test και Mann Whitney. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή p-value < 0,05 ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean±SD).

3.7 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS και Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

3.7.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer)
 - 30 mM Tris (Invitrogen)
 - 10% Glycerol (Invitrogen) 150 mM NaCl (Sharlau)
 - 1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών
- Αναστολείς φωσφατασών

Πειραματική διαδικασία

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών αρχικά απομακρύνουμε το θρεπτικό από την φλάσκα και στη συνέχεια ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS δυο φορές (5ml). Προσθέτουμε 1ml θρυψίνη και επωάζουμε στον κλίβανο για 3-4 λεπτά. Με το πέρασμα των 3 λεπτών παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων (αν όχι τότε χρησιμοποιούμε scraper),

και προσθέτουμε 5ml νέου πλήρους θρεπτικού. Ακολουθεί μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon 15ml και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε 5ml PBS. Φυγοκεντρούμε ξανά τα κύτταρα στις ίδιες συνθήκες όπως και προηγουμένως. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης στο οποίο έχουμε προσθέσει και αναστολείς πρωτεασών . Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε erpendorf και διατήρηση του διαλύματος πρωτεϊνών στον πάγο για 40 λεπτά και ανάδευση σε vortex ανά 10 λεπτά. Τέλος αφού φυγοκεντρήσουμε τα erpendorf στις 13000 στροφές (15 λεπτά, 4° C) μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και το αποθηκεύουμε στους -80° C.

3.7.2 Μέθοδος Bradford

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με την χρήση της μεθόδου Bradford, η οποία στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 με αποτέλεσμα να αλλάζει το μέγιστο της απορρόφησης από τα 460nm σε 595nm. Η χρωστική προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, σχηματίζοντας σύμπλοκο που έχει μπλε χρώμα. Με την μέθοδο αυτή μπορούν να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών γνωστής συγκέντρωση, μια διαδικασία που μαζί με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης οδηγεί στον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ποσότητες πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοός από 1μg έως 20μg (Bovine Serum Albumine, BSA) διαλύονται σε 800μl ddH₂O
- Προσθήκη 200μl χρωστικής Coomassie Brilliant BlueG-250 σε κάθε δείγμα
- Επώαση μείγματος (5 λεπτά, 25°C)
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά των δειγμάτων σε 96-well plate
- Φωτομέτρηση δειγμάτων στα 595 nm
- Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

3.7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS

Αρχή της μεθόδου

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και τον συντελεστή τριβής (f):

$$U = E z / f$$

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας ευκολότερο των διαχωρισμό των πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην καταστολή των ρευμάτων που δημιουργούνται από μικρές θερμοκρασίες. Το μείγμα των πρωτεϊνών αρχικά διαλύεται σε διάλυμα SDS (δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου), ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει

τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δημιουργώντας σύμπλοκο με φορτίο ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται γρηγορότερα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους μετακινούνται με πιο αργό ρυθμό.

Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστικής μπλέ της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMOS.A.)

Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος μέσω ηλεκτροφόρησης, πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη της πολύπλοκης δομής τους. Με την αποδιάταξη τους οι πρωτεΐνες επιστρέφουν στην πρωτοταγή γραμμική διαμόρφωση τους. Η ποσότητα των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

- Πρωτεΐνη : xμl
- Sample buffer: 4μl
- Reducing buffer: 2μl
- ddH₂O: γμl (μέχρι τελικό όγκο 20μl)

Μετά τη δημιουργία του μείγματος τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95° C για 5 λεπτά.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο είναι κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Το πήκτωμα πακεταρίσματος αποσκοπεί στην συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μια ζώνη, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος να φτάσουν μαζί στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- Προσθήκη 600ml Running buffer 1X τόσο στο μπροστινό όσο και στο οπίσθιο μέρος της συσκευής.
- Τοποθέτηση του gel πολυακρυλαμίδιου στο μεσαίο τμήμα της συσκευής
- Προσθήκη 200 ml Running buffer στο μεσαίο τμήμα της συσκευής.

- Στο πρώτο πηγαδάκι του gel φορτώνεται ο ladder
- Ρύθμιση της έντασης στα 70 Volt για 15 λεπτά. Μετά τα 15 λεπτά ρυθμίζουμε τα Volt στα 180 για 40 λεπτά.

3.7.4 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων της υπό μελέτης πρωτεΐνης. Βασίζεται στην δράση δύο αντισωμάτων, ενός πρωτογενούς και ενός δευτερογενούς. Το πρωτογενές αντίσωμα θα αναγνωρίσει σαν αντιγόνο την υπό μελέτη πρωτεΐνη και προσκολλάται σε αυτή, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρωτογενές. Η σήμανση του δευτερογενούς αντισώματος με ένζυμο όπως την υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) μας δίνει την δυνατότητα να οπτικοποιήσουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF επειδή δημιουργεί ζώνες που αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

Υλικά ανοσοαποτύπωσης κατά Western

A. Διαλύματα

- Διάλυμα μεταφοράς των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμιδίου σε ειδική μεμβράνη
 - 5% Transfer buffer (NuPage Transfer buffer, Invitrogen)
 - 1% μεθανόλη (Applichem)
- Διάλυμα πλύσης
 - 50 mM Tris (Invitrogen)
 - 150mM NaCl (Sharlau)
 - 1mM EDTA (Sharlau)
 - 0.05% Tween (Bio-Rad)
- Διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων σύνδεσης αντισωμάτων
 - 2,5 gr non fat dry milk powder
 - 50 ml TBS-T

B. Υλικά

- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, Thermo Scientific)
- Χαρτί τύπου Whitman
- Μεμβράνη PVDF
- Ειδικά σφουγγαράκια

Γ. Αντισώματα

- Πρωτοταγή αντισώματα
 1. NRF2 (1:750 dilution, Cell Signaling Technology, #12721)
 2. SOD1 (1:1000 519 dilution, Cell Signaling Technology, #4266)
 3. NQO1 (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #3187)
 4. GCLC (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #48005)
 5. GPX1 (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #3286)
 6. TXN (1:750 dilution, Cell Signaling Technology, #2429)
 7. HMOX1 (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #5853)

8. CAT (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #12980)
9. GSR (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, #sc-133245)
10. Antibody against β -actin (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology)
11. Antibodies against alpha-Tubulin 527 (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, #2125)
12. Antibodies against Histone H3 (1:1000 dilution, Abcam ab1791)

➤ Δευτεροταγή αντισώματα

1. Antirabbit; 1:5000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, #sc-133245
2. Antimouse 1:5000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, #sc-525408

Η χρήση του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της β -actin χρησιμοποιείται ως control για τα επίπεδα των πρωτεϊνών, ενώ εναντίον των πρωτεϊνών alpha-Tubulin και Histone H3 χρησιμοποιούνται ως control για τυχών κυτταροπλασματικά και πυρηνικά κλάσματα, αντίστοιχα.

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιούμε την συσκευή Trans-Blot Wet Tranfer Cell (Bio-Rad) για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

- Αρχικά για να ενεργοποιηθεί η μεμβράνη PVDF στην οποία θα μεταφερθούν οι πρωτεΐνες την τοποθετούμε σε μεθανόλη για 15 λεπτά.
- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών, τοποθετούμε το gel πολυακρυλαμίδης, την μεμβράνη PVDF και τα χαρτάκια Whittman σε Transfer Buffer για 20 λεπτά.
- Στο καλούπι της συσκευής τοποθετούμε κατά σειρά: τα σφουγγαράκια, ένα χαρτάκι Whittman, την μεμβράνη PVDF, το gel πολυακρυλαμιδίου, ακόμα ένα χαρτάκι Whittman και τέλος ένα ακόμα σφουγγαράκι, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια δομή που μοιάζει με 'sandwich'.
- Τοποθετούμε το sandwich στην συσκευή και την ενεργοποιούμε αφού την ορίσουμε στα 400 μ A για 90 λεπτά ώστε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το gel στην μεμβράνη.
- Με το πέρασμα της μίας ώρας για να σιγουρευτούμε ότι έχει γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη αφού απομονώσουμε την μεμβράνη από την συσκευή κάνουμε χρώση της μεμβράνης με Ponceau, μια κόκκινη χρωστική που εμφανίζει τις ζώνες των πρωτεϊνών.
- Στη συνέχεια ξεπλένουμε την μεμβράνη με TBS για 10 λεπτά για 3 επαναλήψεις υπό συνεχή ανάδευση.
- Για να καλύψουμε τις μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος επωάζουμε την μεμβράνη για 60 λεπτά σε Blocking buffer 5%.
- Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις) και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα στους 4^ο C ολονύχτια με ανάδευση.

- Την επόμενη ημέρα αφού ξεπλύνουμε την μεμβράνη με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις) την επωάζουμε με τον δεύτερο αντίσωμα για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση.
- Ξεπλύνουμε την μεμβράνη με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις).

Τελική διεργασία αποτελεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων. Η μεμβράνη αρχικά επωάζεται σε ενισχυτικό σήματος (ECL) για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το ενισχυτικό με διηθητικό χαρτί και μεταφέρουμε την μεμβράνη σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τρέχουμε το πρόγραμμα από τον υπολογιστή και τέλος ποσοτικοποιούμε τα σήματα των μπαντών με το πρόγραμμα IMAGE J.

3.8 Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της Nrf2 πρωτεΐνης

Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Nrf2 στον πυρήνα των κυττάρων. Συγκεκριμένα, 1×10^5 κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες σε 6 well-plates μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη για 10 λεπτά στους -20°C . Στη συνέχεια αφού αρχικά μπλοκαρίστηκαν με PBS το οποίο περιείχε 0,2% Tween20 και 1% BSA για 10 λεπτά, στις καλυπτρίδες με τα κύτταρα προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα της πρωτεΐνης Nrf2 (1:100, 1:750 αραιώση, Cell Signaling Technology, #12721) για 16h στους 4°C . Ακολούθησε επώαση με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα που ήταν συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική για 1h (1:500 αραιώση, Alexa Fluor 594, Molecular Probes). Οι εικόνες λήφθηκαν χρησιμοποιώντας το συνεστιακό μικροσκόπιο ZEISS LSM 800 και αναλύθηκαν με το λογισμικό ImageJ. Αναλύθηκαν τουλάχιστον πέντε τυχαία επιλεγμένα πεδία με τουλάχιστον 200 κύτταρα για κάθε χρονικό σημείο ή οποιαδήποτε άλλη κατάσταση. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των μετρήσεων.

3.9 Υποκυτταρική κλασματοποίηση για τον προσδιορισμό της Nrf2 πρωτεΐνης

Τα WJ-MSCs ύστερα από κάλυψη του 65-70% της επιφάνειας καλλιεργητικών φλασκών 25 cm^2 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με HME ($100 \mu\text{g/mL}$) για 6, 12 και 24 ώρες. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέχθηκαν σε eppendorf $1,5 \text{ mL}$. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε $150 \mu\text{L}$ κρούου ρυθμιστικού διαλύματος Α (το οποίο περιείχε 10 mM HEPES-KOH pH 7,6 at 4°C , $1,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM PMSF, $0,5 \text{ mM}$ DTT) στο οποίο προστέθηκε μείγμα αναστολέων φωσφατασών και πρωτεασών (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Η επώαση έγινε για 30 λεπτά σε πάγο με ταυτόχρονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα κάθε 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7,000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C (κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα). Στη συνέχεια προστέθηκαν στο ίζημα $150 \mu\text{L}$ παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Β (20 mM HEPES-KOH pH 7,6, $1,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , 420 mM NaCl, $0,2 \text{ mM}$ EDTA, 1 mM PMSF, $0,5 \text{ mM}$ DTT 25% γλυκερόλης) συμπληρωμένο με μίγμα αναστολέων φωσφατασών και πρωτεασών (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) και ακολούθησε επώαση στον πάγο με ταυτόχρονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα κάθε 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7,000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και

αποθηκεύτηκε στους -20°C (πυρηνικό πρωτεϊνικό κλάσμα). Τόσο το κυτταροπλασματικό όσο και το πυρηνικό πρωτεϊνικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων του Nrf2 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

3.10 Προσδιορισμός της προστασίας από βλάβες του DNA στα WJ-MSCs κύτταρα με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού

Ύστερα από επίδραση στα WJ-MSCs κύτταρα με HME ή/και H_2O_2 αξιολογήθηκαν τα δίκλωνα θραύσματα DNA (DSB) με την χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση των DSB, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με μονιμοποιημένα κύτταρα επωάστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη 53BP1 (1:500, clone BP13, mouse monoclonal, Millipore, ΗΠΑ) ή με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την ιστόνη $\gamma\text{-H2AX}$ X (1:200, 05-636, clone JBW301, mouse monoclonal, 579 Millipore, ΗΠΑ) και το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα (1:500 dilution, Alexa 580 Fluor 488, Molecular Probes). Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια επωάστηκαν σε 10 μL μέσου στερέωσης Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) το οποίο περιείχε την χρωστική DAPI για την οπτικοποίηση των πυρήνων. Οι εικόνες λήφθηκαν χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS Axio Imager Z2 και αναλύθηκαν με το λογισμικό ImageJ. Αναλύθηκαν τουλάχιστον πέντε τυχαία επιλεγμένα πεδία με τουλάχιστον 200 κύτταρα. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των μετρήσεων.

3.11 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA ακολουθούμενη από το τεστ του Dunnett για συγκρίσεις πολλαπλών ζευγών. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρούνταν όσες είχαν τιμή $p < 0,05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα SPSS (έκδοση 14.0).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός των επιδράσεων του HME σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε WJ-MSCs

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος HME στα ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα προσδιορίστηκε η επίδραση του στους δείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα οι αλλαγές στα TBARS (επίπεδα υπεροξειδωσης λιπιδίων), CARB (επίπεδα οξειδωσης πρωτεϊνών), TAC (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα), GSH (επίπεδα γλουταθειόνης) καθώς και τα συνολικά επίπεδα των ROS.

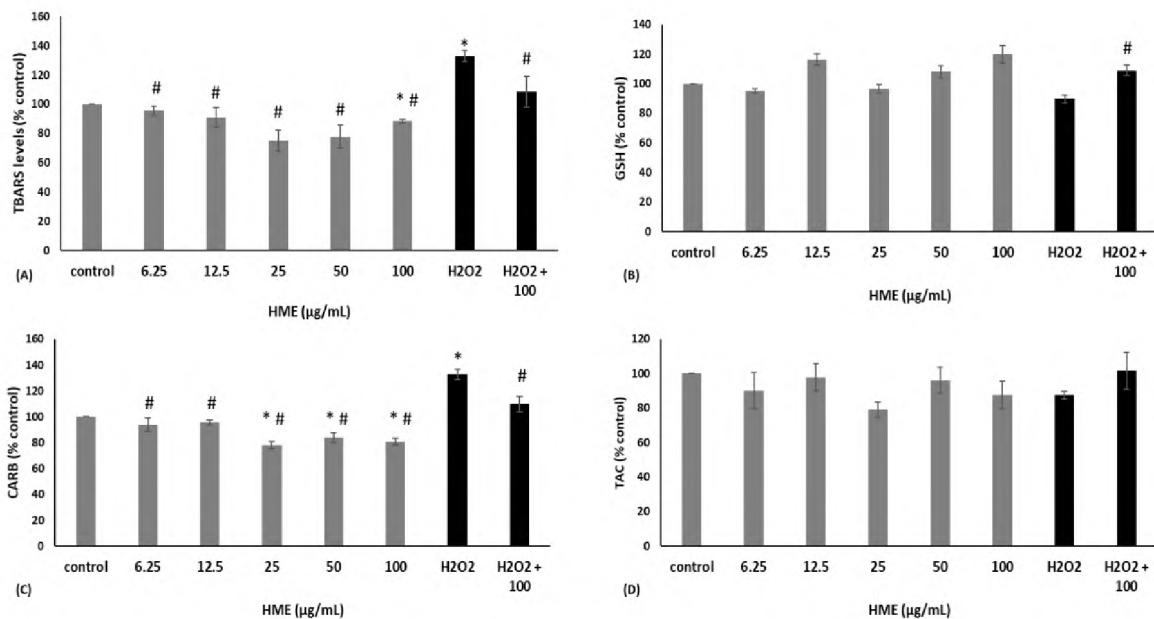
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

Η επίδραση μόνο με HME:

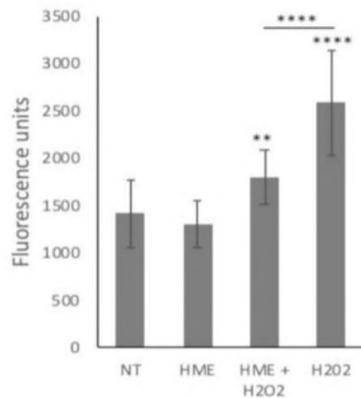
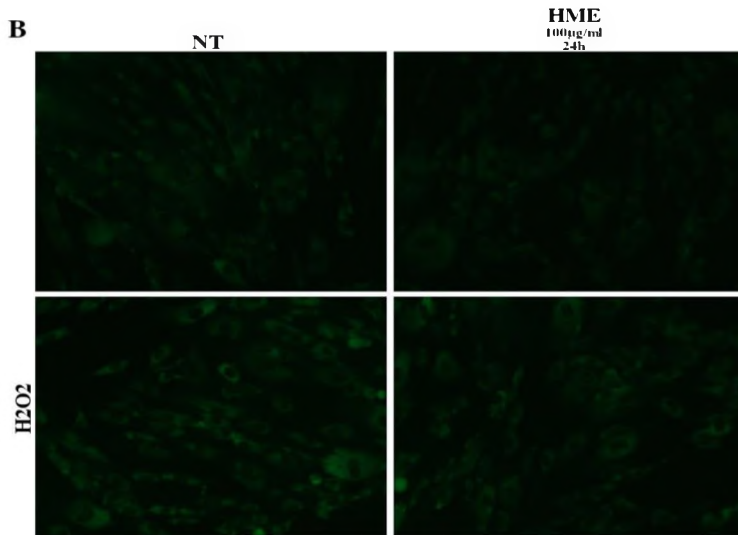
- Οδήγησε σε μείωση του δείκτη TBARS κατά 11,75% σε συγκέντρωση HME 100 µg/mL, σε σύγκριση με το control (Διάγραμμα 1A).
- Επιπλέον τα επίπεδα CARB παρουσίασαν μείωση κατά 22,30, 16,22 και 19,54% σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 µg/mL αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control (Διάγραμμα 1C).
- Δεν επηρέασε τα επίπεδα GSH, TAC και ROS (Διάγραμμα 1B,D, Διάγραμμα 2A,B).

Η επίδραση με HME (100 µg/mL) για 24 ώρες ακολουθούμενη από οξειδωτικό στρες:

- Οδήγησε σε μείωση των δεικτών TBARS, CARB και ROS κατά 24,62, 23,08 και 31,70% αντίστοιχα σε σύγκριση με το control (Διάγραμμα 1 A,C; Διάγραμμα 2A).
- Αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 19,32%, σε σύγκριση με την επίδραση μόνο με H₂O₂ (Διάγραμμα 1B).
- Δεν επηρέασε τα επίπεδα της TAC (Διάγραμμα 1D).



Διάγραμμα 1: Οι επιδράσεις του εκχυλίσματος HME στα επίπεδα (A) TBARS, (B) CARB, (C) GSH και (D) TAC σε WJ-MSCs κύτταρα ύστερα από την επίδραση του παρουσίας ή όχι H₂O₂. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ($\pm$ SEM) τριών πειραμάτων. * Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το control ($p < 0,05$). # Στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με την επίδραση μόνο με H₂O₂ ($p < 0,05$).

A**B**

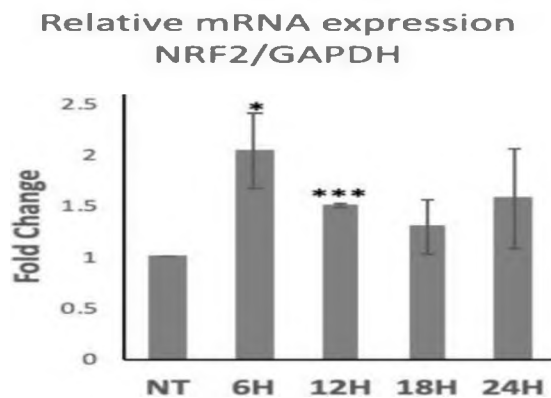
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός της προστασίας του εκχυλίσματος HME ύστερα από επαγωγή των επιπέδων ROS από οξειδωτικό στρες (H_2O_2) στα WJ-MSCs κύτταρα. **(Α)** Γράφημα το οποίο δείχνει τις μονάδες φθορισμού που αντιπροσωπεύουν τα συνολικά επίπεδα ROS για κάθε συνθήκη. Τα επίπεδα ROS προσδιορίστηκαν σε 4 συνθήκες: i) κύτταρα μάρτυρες (NT), ii) κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση μόνο με HME για 24 ώρες, iii) κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το εκχύλισμα για 24 ώρες και στη συνέχεια επίδραση με H_2O_2 για 30 λεπτά, iv) κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση μόνο με H_2O_2 για 30 λεπτά. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ S.E.M. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, χρησιμοποιώντας ως control την NT κατάσταση. **(Β)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων WJ-MSCs κάθε συνθήκης όπου προσδιορίστηκαν τα συνολικά επίπεδα ROS. Οι εικόνες καταγράφηκαν με τον αντικειμενοφόρο φακό μεγέθυνσης 40X του μικροσκοπίου φθορισμού.

4.2 Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος HME στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 στα WJ-MSCs

A. Επίπεδα mRNA

Παρατηρούμε ότι:

- Η επίδραση με το εκχύλισμα HME αύξησε τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου NFE2L2 το οποίο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 κατά 2 φορές και κατά 1,5 φορές στις 6h και στις 12h αντίστοιχα σε σύγκριση με την NT κατάσταση (Διάγραμμα 3).

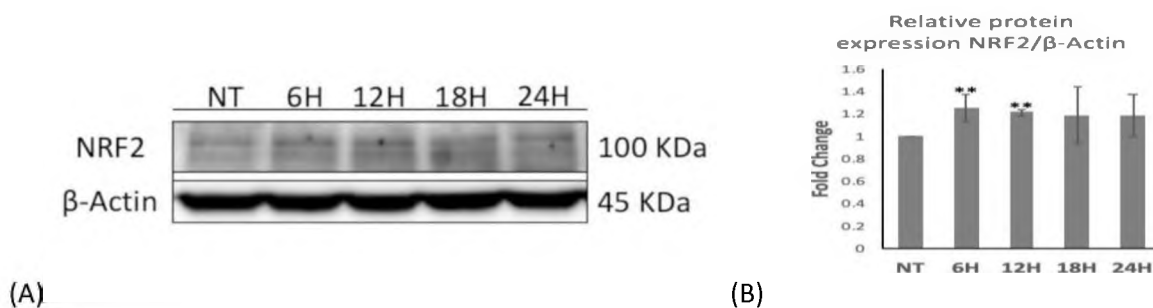


Διάγραμμα 3: Γράφημα το οποίο δείχνει τις αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NFE2L2 (κωδικοποιεί τον Nrf2) μετά από επίδραση με HME (100 $\mu\text{g/mL}$) για 4 διαφορετικούς χρόνους (NT=χωρίς επίδραση). Χρησιμοποιήθηκε qRT-PCR για την αξιολόγηση των επιπέδων mRNA και έγινε σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Nrf2/GAPDH). Οι τιμές που εμφανίζονται είναι οι μέσοι όροι $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ έναντι της συνθήκης NT.

B. Επίπεδα πρωτεΐνης

Παρατηρούμε ότι:

- Ύστερα από επίδραση με HME αυξήθηκαν και τα επίπεδα της πρωτεΐνης Nrf2, και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση κατά 25% και 21% στις 6h και 12h αντίστοιχα (Διάγραμμα 4).

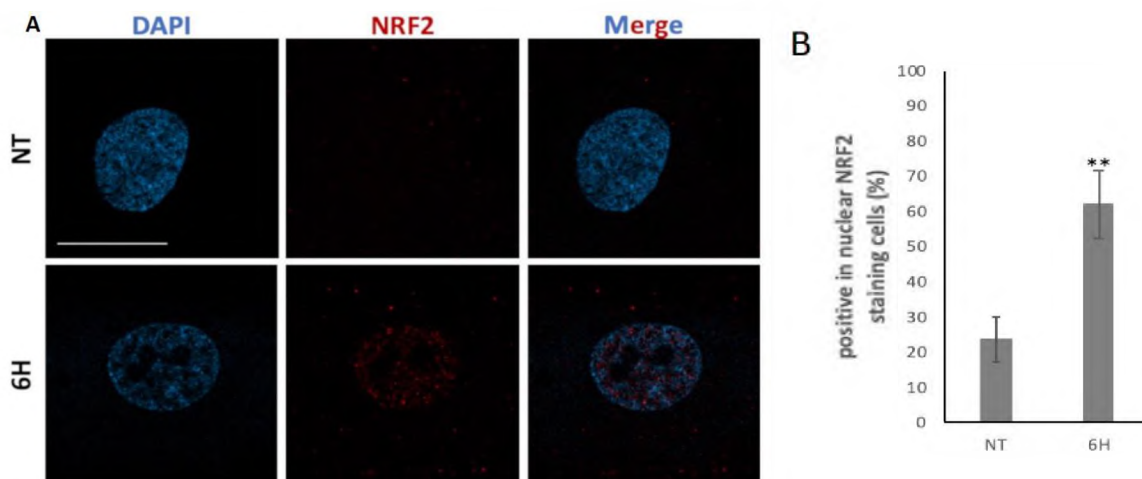


Διάγραμμα 4: (A) Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη Nrf2 μετά από επίδραση με HME (100 $\mu\text{g/mL}$) σε 4 χρονικά σημεία χρησιμοποιώντας την β-ακτίνη ως loading control. (NT=χωρίς επίδραση). (B) Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων της πρωτεΐνης Nrf2. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ για την ποσοτικοποίηση. Οι τιμές που εμφανίζονται είναι οι μέσοι όροι $\pm$ S.E.M. ** $p < 0,01$, έναντι της συνθήκης NT.

Γ. Μετατόπιση του Nrf2 στον πυρήνα

Παρατηρούμε ότι:

- Η επίδραση με τον εκχύλισμα για 6 ώρες οδήγησε σε σημαντική μετατόπιση του Nrf2 στον πυρήνα των κυττάρων σε σύγκριση με το control, συγκεκριμένα στο 62% των κυττάρων που έγινε επίδραση έναντι 23,6% των μη επεξεργασμένων κυττάρων (Διάγραμμα 5Α,Β).
- Στο πυρηνικό κλάσμα των WJ-MSCs κυττάρων που επεξεργάστηκαν με το HME αυξήθηκαν τα επίπεδα του Nrf2 σε σύγκριση με τα NT κύτταρα (Διάγραμμα 5Γ).



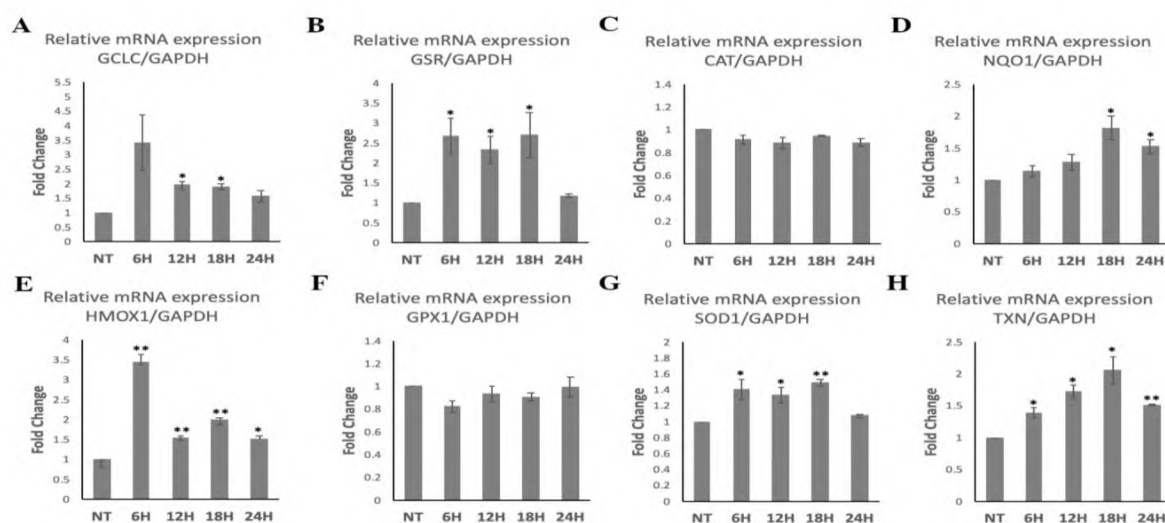
(Γ)

Διάγραμμα 5: (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων WJ-MSCs που χρωματίστηκαν για τον Nrf2 σε NT κύτταρα και σε κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με HME για 6h. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με DAPI. Οι εικόνες καταγράφηκαν με αντικειμενοφόρο φακό μεγέθυνσης 40X του μικροσκοπίου φθορισμού. (Β) Γράφημα το οποίο δείχνει το ποσοστό των θετικών κυττάρων στην χρώση του πυρηνικού Nrf2 σε NT κύτταρα και σε κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με HME για 6h. (Γ) Ανοσοαποτύπωση Western του Nrf2 στο πυρηνικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα των WJ-MSCs. Οι τιμές που εμφανίζονται είναι οι μέσοι όροι $\pm$ S.E.M. ** $p < 0,01$, έναντι της συνθήκης NT.

4.3 Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος HME στα επίπεδα mRNA των ενζύμων στόχων του Nrf2

➤ Παρατηρούμε ότι:

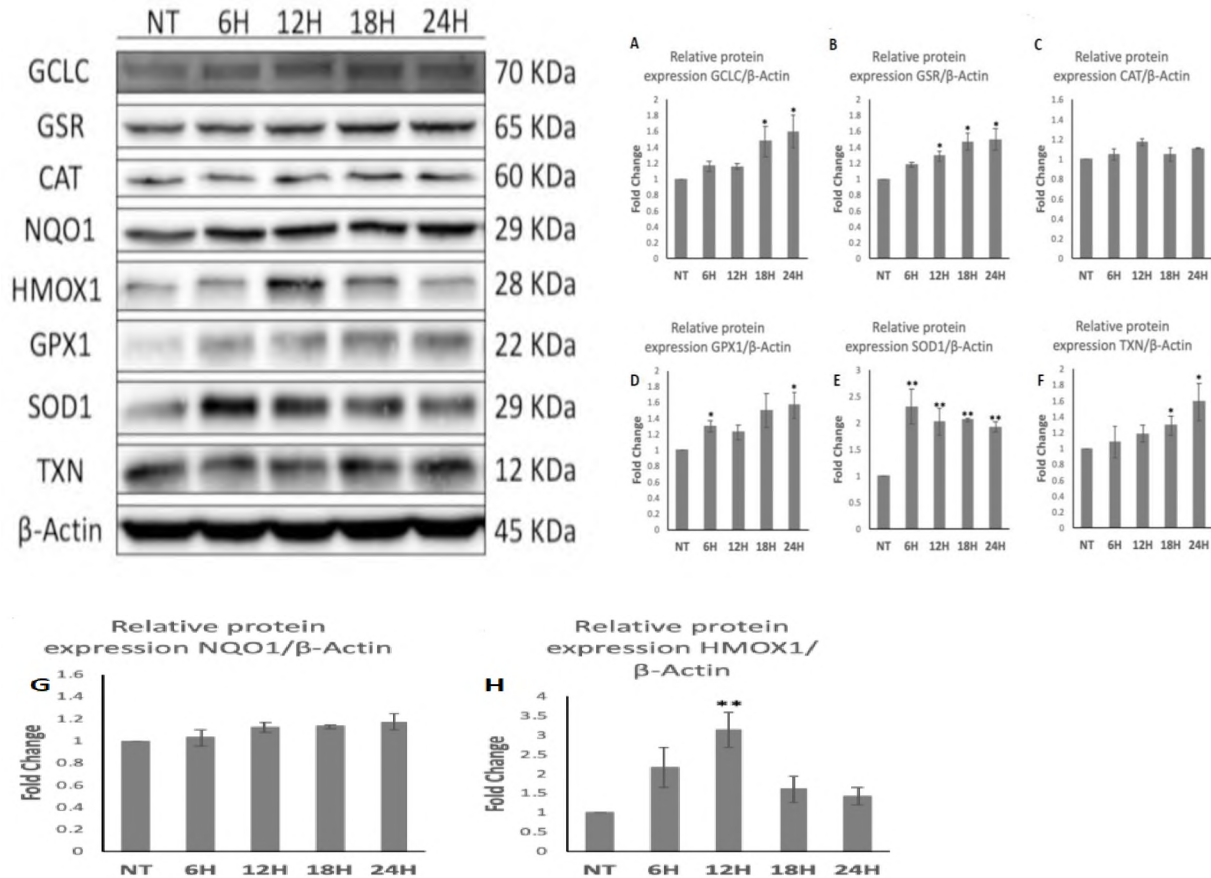
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου GCLC κατά 1,95 και 1,9 φορές στις 12h και 18h αντίστοιχα (Διάγραμμα 6A).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου GSR κατά 2,66, 2,33 και 2,69 φορές στις 6h, 12h και 18h αντίστοιχα (Διάγραμμα 6B).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου NQO1 κατά 1,81 και 1,53 φορές στις 18h και 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 5D).
- Αύξηση υπάρχει και για τα επίπεδα mRNA του γονιδίου HMOX1 κατά 3,42, 1,54, 1,97, 1,49 φορές στις 6h, 12h, 18h, 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 5E).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου SOD1 κατά 1,40, 1,33 και 1,49 φορές στις 6h, 12h και 18h αντίστοιχα (Διάγραμμα 5G).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου TXN κατά 1,38, 1,71, 2,05 and 1,51 φορές στις 6, 12h, 18h and 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 6H).
- Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα mRNA των γονιδίων GPX1 και CAT (Διάγραμμα 6C,F).



Διάγραμμα 6: Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων GCLC, GSR, CAT, NQO1, HMOX1, GPX1, SOD1 και TXN στα κύτταρα WJ-MSCs μετά από επίδραση με HME σε 4 χρονικά σημεία. Χρησιμοποιήθηκε qRT-PCR για την αξιολόγηση των επιπέδων mRNA και έγινε σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH. Ως τιμή για το NT χρησιμοποιήθηκε αυθαίρετα το 1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ S.E.M. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ έναντι του NT.

4.4 Προσδιορισμός της επίδρασης στα επίπεδα πρωτεϊνών των γονιδίων στόχων του Nrf2

- Παρατηρούμε ότι:
- Από την ανοσοαποτύπωση κατά Western συμπεραίνουμε ότι η επίδραση με το εκχύλισμα HME στα WJ-MSCs αύξησε τα επίπεδα των πρωτεϊνών GCLC, GSR, NQO1, HMOX1, SOD1 και TXN, ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα των πρωτεϊνών CAT και NQO1 (Διάγραμμα 7).
- Υπάρχει αύξηση της πρωτεΐνης GCLC κατά 1,47 και 1.59 φορές στις 18h and 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 7A).
- Υπάρχει αύξηση της πρωτεΐνης GSR κατά 1.29, 1.46 και 1.49 φορές στις 12h, 18h and 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 7B).
- Υπάρχει αύξηση της πρωτεΐνης GPX1 κατά 1.3 και 1.56 φορές στις 6h and 24 h αντίστοιχα (Διάγραμμα 7C).
- Υπάρχει αύξηση της πρωτεΐνης HMOX1 κατά 3.12 φορές στις 12h (Διάγραμμα 7G).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης SOD1 κατά 2.3, 2,01, 2.06 και 1.49 φορές στις 6h, 12h, 18h και 24h αντίστοιχα (Διάγραμμα 7E).
- Αυξήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης TXN κατά 1.28 και 1.58 φορές στις 18h and 24 h αντίστοιχα (Διάγραμμα 7F).
- Τέλος παρατηρούμε ότι η επίδραση με το HME στα καλλιεργούμενα κύτταρα δεν επηρέασε τα επίπεδα των πρωτεϊνών CAT και NQO1 (Διάγραμμα 7C,G).



Διάγραμμα 7: Ανοσοαποτύπωση Western για τις πρωτεΐνες GCLC, GSR, CAT, NQO1, HMOX1, GPX1, SOD1 και TXN ύστερα από επίδραση με HME (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε 4 χρονικά σημεία (NT= χωρίς επίδραση) και χρησιμοποιώντας ως loading control την β -actin. (A-H) Διαγράμματα τα οποία δείχνουν τις αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών σε σχέση με το NT μετά από κανονικοποίηση ως προς τη β -Actin. Ως τιμή για το NT χρησιμοποιήθηκε αυθαίρετα το 1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ σε σχέση με το NT.

4.6 Εκτίμηση της προστασίας του HME στα WJ-MSCs έναντι των προκαλούμενων από τα ROS δίκλωνων θραυσμάτων DNA (DBS)

Για την εκτίμηση της προστασίας του εκχυλίσματος HME από βλάβες DNA που προκαλούνται από ROS σε WJ-MSCs αξιολογήθηκε ο σχηματισμός δίκλωνων ρήξεων DNA (DBS). Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ιστόνης γ -H2AX η οποία αποτελεί ένα δείκτη δίκλωνων θραυσμάτων DNA καθώς και τα επίπεδα της πρωτεΐνης 53BP1 η οποία συμμετέχει σε μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών γ -H2AX και 53BP1. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 4 συνθήκες i) μη επεξεργασμένα κύτταρα (NT), ii) επίδραση μόνο με HME για 24h, iii) επίδραση με HME ακολουθούμενη από επίδραση με H_2O_2 για 30 min, iv) επίδραση για 30 min με H_2O_2 .

A) Επίπεδα πρωτεϊνών

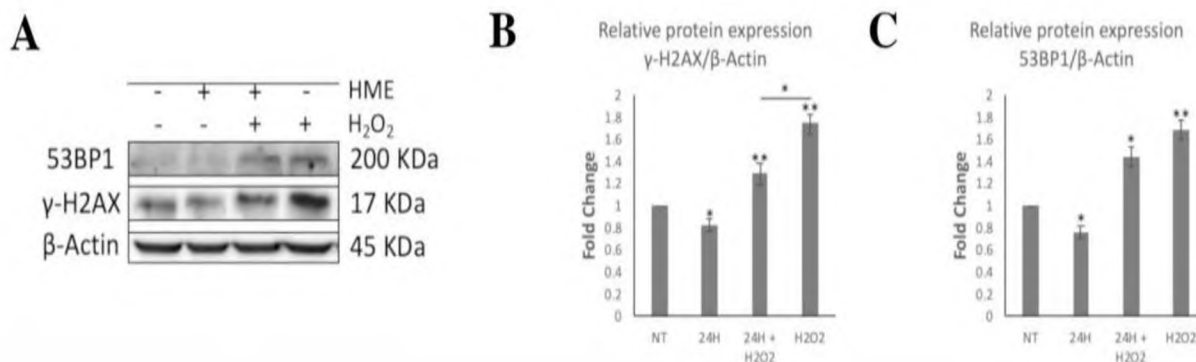
Παρατηρούμε ότι:

- Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της γ -H2AX μειώθηκαν κατά 25,86% σε κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το εκχύλισμα πριν την επίδραση με H_2O_2 σε σύγκριση με κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση μόνο με υπεροξείδιο του υδρογόνου (Διάγραμμα 8A,B).
- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της 53BP1 ύστερα από επίδραση με HME για 24h ακολουθούμενη από επίδραση με H_2O_2 για 30 min σε σύγκριση με την επίδραση μόνο με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Διάγραμμα 8 A,C)
- Ωστόσο τα επίπεδα των πρωτεϊνών γ -H2AX και 53BP1 μειώθηκαν κατά 18,00 and 24,00% αντίστοιχα στα κύτταρα που έγινε επίδραση με HME σε σχέση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα (NT) (Διάγραμμα 8A,B,C)

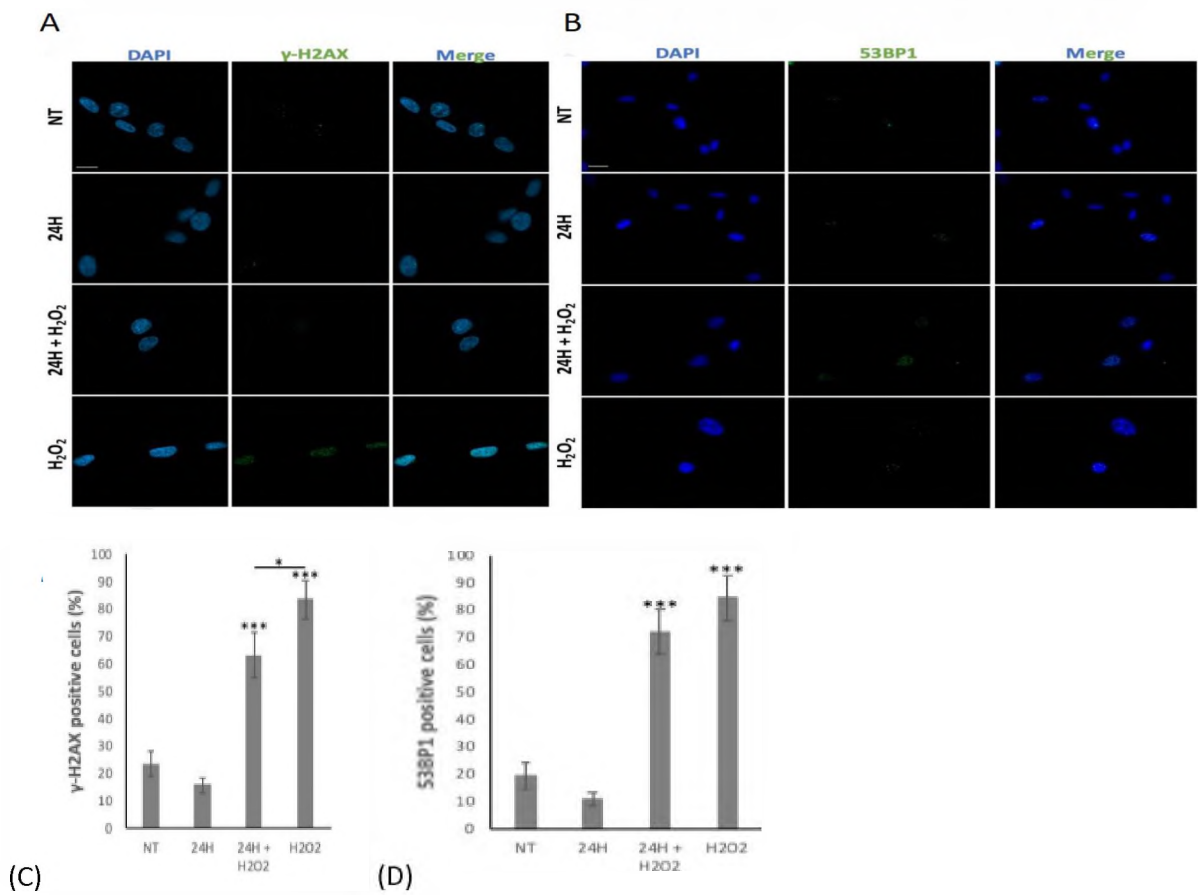
B) Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών γ -H2AX και 53BP1

Παρατηρούμε ότι:

- Στα κύτταρα όπου έγινε επίδραση με HME για 24h πριν την επίδραση με H_2O_2 το ποσοστό των θετικών κυττάρων για την γ -H2AX πρωτεΐνη μειώθηκε κατά 20,3% σε σύγκριση με τα κύτταρα που επιδράσαμε μόνο H_2O_2 (Διάγραμμα 9A,C)
- Υπήρχε μείωση αλλά όχι στατιστικά σημαντική στο ποσοστό των θετικών κυττάρων για την πρωτεΐνη 53BP1 στα κύτταρα που επιδράσαμε με HME πριν την επίδραση με H_2O_2 σε σύγκριση με τα κύτταρα που επιδράσαμε μόνο με H_2O_2 (Διάγραμμα 9B,D).
- Η μείωση των θετικών κυττάρων για τη 53BP1 και τη γ -H2AX κύτταρα δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των κυττάρων που επιδράσαμε μόνο με HME και των μη επεξεργασμένων κυττάρων (Διάγραμμα 9A-D).



Διάγραμμα 8: (A) Ανοσοαποτύπωση κατά Western στην οποία εμφανίζεται η έκφραση των πρωτεϊνών γ -H2AX και 53BP1. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β -actin. **(B)** και **(C)** Διαγράμματα στα οποία φαίνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των γ -H2AX και 53BP1, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στις μέσες τιμές $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ χρησιμοποιώντας ως control την συνθήκη NT.



Διάγραμμα 9: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων WJ-MSCs στα οποία έγινε χρώση των πρωτεϊνών γ-H2AX (A) και 53BP1 (B). Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Οι εικόνες καταγράφηκαν με την χρήση του αντικειμενοφόρου φακού μεγέθυνσης 40X του μικροσκοπίου φθορισμού confocal και του μικροσκοπίου φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των γ-H2AX και 53BP1, αντίστοιχα. Διαγράμματα στα οποία φαίνεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στην χρώση με (C) γ-H2AX και (D) 53BP1. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές $\pm$ S.E.M. *** $p < 0,001$ σε σύγκριση με την NT κατάσταση.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση εκχυλίσματος (HME) από το φύκος *H. musciformis* το οποίο είχε συλλεχθεί από το Βόρειο Αιγαίο Πέλαγος, στην αντιοξειδωτική κατάσταση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (WJ-MSCs).

Αρχικά εξετάστηκαν οι επιδράσεις του HME, σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, στην αντιοξειδωτική κατάσταση των WJ-MSCs είτε χωρίς είτε υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες (επίδραση με H_2O_2). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επίδραση με HME σε συγκέντρωση 100μg/mL για 24h μείωσε σημαντικά την υπεροξείδωση των λιπιδίων (TBARS) καθώς και την οξείδωση των πρωτεϊνών (CARB) σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 mg/mL. Επιπλέον η επίδραση με HME για 24 ώρες στα WJ-MSCs πριν την έκθεση τους στο H_2O_2 μείωσε τα επίπεδα ROS και κατά συνέπεια τους δείκτες TBARS και CARB, σε σύγκριση με κύτταρα στα οποία έγινε μόνο επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι το HME προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες του οξειδωτικού στρες. Η προστασία των κυττάρων από την λιπιδική υπεροξείδωση είναι σημαντική καθώς μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς επιπτώσεις σε διάφορα κυτταρικά συστατικά και ιδιαίτερα στις κυτταρικές μεμβράνες και εν τέλει να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Gaschler & Stockwell, 2017). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη γήρανση των βλαστοκυττάρων (Papsdorf & Brunet, 2019). Σημαντική είναι και η προστασία που προσφέρει το HME έναντι της οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς οι τροποποιήσεις των πρωτεϊνών από τα ROS μπορούν να μεταβάλουν τη λειτουργία ενζύμων, υποδοχέων και δομικών συστατικών (Kehm et al., 2021). Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση των επιπέδων της GSH, ενός από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια (Haddad Mohamed et al., 2021), στα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το εκχύλισμα πριν την επαγωγή οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση μόνο με H_2O_2 . Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι η προστασία του HME στα κύτταρα έναντι του οξειδωτικού στρες οφειλόταν εν μέρει στην ενίσχυση του συστήματος της GSH. Ωστόσο, η επεξεργασία των κυττάρων με HME δεν επηρέασε την TAC, ένα δείκτη των συνολικών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μορίων στα κύτταρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το HME μπορεί να αυξήσει ορισμένα αντιοξειδωτικά μόρια (π.χ GSH) στα WJ-MSCs αλλά ως αποτέλεσμα αντιστάθμισης ορισμένα άλλα αντιοξειδωτικά να μειώθηκαν (Alvarez & Boveris, 2000) και κατά συνέπεια η TAC δεν άλλαξε. Γενικότερα, στην παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη φορά που εκχύλισμα από το *Hypnea musciformis* δείχθηκε ότι αναστέλλει την οξείδωση των πρωτεϊνών. Επίσης, τα αποτελέσματά μας ήταν σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι HME ανέστειλε την υπεροξείδωση των λιπιδίων *in vitro* (Chakraborty et al., 2016; das Chagas Faustino Alves et al., 2012; Roza et al., 2019) και *in vivo* στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και τον εντερικό ιστό αρουραίων (Balamurugan et al., 2017a; T. V. Brito et al., 2016). Επιπλέον, η χορήγηση HME σε αρουραίους έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τη GSH στα ερυθροκύτταρα και σε μαστικό και εντερικό ιστό (Balamurugan et al., 2017a; T. V. Brito et al., 2016).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανή προστασία που μπορεί να επιφέρει το εκχύλισμα HME έναντι των προκαλούμενων από το H_2O_2 βλαβών στο DNA στα WJ-MSCs. Η επίδραση με HME (100μg/ml) για 24h πριν την επίδραση με H_2O_2 μείωσε το ποσοστό τόσο των θετικών για την γ-H2AX κυττάρων όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης γ-H2AX, σε σύγκριση με τα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν μόνο σε H_2O_2 . Το γ-H2AX σχηματίζεται ύστερα από φωσφορυλίωση της ser139 της ιστόνης H2AX όταν πραγματοποιείται επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων DNA (DBS) (Mah et al., 2010). Ωστόσο κατά την επίδραση με HME υπό τις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της πρωτεΐνης 53BP1. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η πρωτεΐνη 53BP1 θεωρείται επίσης ένας δείκτης βλάβης του DNA καθώς αποτελεί βασικό συστατικό της διαδικασίας σηματοδότησης και επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων

του DNA (Stephanie Panier & Simon J Boulton, 2013). Δεδομένου ότι η επιδιόρθωση των DSBs περιλαμβάνει αρχικά τον σχηματισμό των γ-H2AX και στη συνέχεια την ενεργοποίηση της 53BP1 (Siddiqui et al., 2015), η γ-H2AX αποτελεί έναν πιο ευαίσθητο δείκτη από την 53BP1 για τις DSB. Παρατηρήσαμε επίσης ότι κατά την επίδραση με HME στα WJ-MSCs για 24 ώρες μειώθηκαν τόσο τα επίπεδα έκφρασης της γ-H2AX όσο και της πρωτεΐνης 53BP1 σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα, γεγονός το οποίο μας δείχνει ότι το HME οδηγεί σε μείωση των βασικών επιπέδων βλαβών του DNA. Υπήρξε επίσης μια ακόμη μελέτη που δείχνει ότι HME μείωσε τη γενotoξικότητα που προκαλείται από ROS σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Vatan O. et al., 2011). Η προστασία από βλάβες του DNA που προκαλούνται από ROS στα κύτταρα είναι σημαντική, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και ασθένειες όπως η καρκινογένεση (Alhmod et al., 2020). Επιπλέον, οι βλάβες του DNA στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε γήρανση, απόπτωση, μείωση της ικανότητάς τους για διαφοροποίηση και αυτοανανέωση (Banimohamad-Shotorbani et al., 2020).

Διερευνήθηκαν στη συνέχεια οι επιδράσεις του HME στο μονοπάτι του Nrf2, ενός από τους πιο σημαντικούς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς (Bellezza et al., 2018b). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επεξεργασία με HME σε συγκέντρωση 100 μg/ml ακόμη και στο χρονικό διάστημα των 6h οδήγησε σε σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου NFE2L2 που κωδικοποιεί τον Nrf2 σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε και από την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Nrf2 στα WJ-MSCs στα οποία είχε γίνει επίδραση με HME. Ο Nrf2 αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και για να δράσει θα πρέπει να μετατοπιστεί στον πυρήνα (Bellezza et al., 2018b). Αυτή η μετατόπιση επιβεβαιώθηκε με δύο τρόπους i) από τη χρώση με υψηλότερο ανοσοφθορισμό των πυρήνων των κυττάρων για τα επίπεδα του Nrf2 και ii) με την αύξηση των επιπέδων του Nrf2 στο πυρηνικό κλάσμα των WJ-MSC που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με HME σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που καταδεικνύει ότι εκχύλισμα του *H. musciformis* επάγει την ενεργοποίηση του Nrf2 σε ανθρώπινα κύτταρα.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της επαγόμενης ενεργοποίησης του Nrf2 από την επίδραση με το εκχύλισμα HME, εξετάστηκε η έκφραση οκτώ γονιδίων στόχων του Nrf2 σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων GCLC, GSR, NQO1, HMOX1, SOD1 και TXN, ενώ δεν μεταβλήθηκαν τα επίπεδα των γονιδίων CAT και GPX1. Για τα πρωτεϊνικά επίπεδα παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνών GCLC, GSR, HMOX1, SOD1 ενώ σε αντίθεση με τα επίπεδα mRNA αυξήθηκε και η έκφραση της πρωτεΐνης GPX1. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση για την πρωτεΐνη CAT (όπως συνέβη και με τα επίπεδα του mRNA), ενώ δεν μεταβλήθηκαν ούτε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του γονιδίου NQO1 το οποίο όμως είχε εμφανίσει αύξηση σε μεταγραφικό επίπεδο. Οι αποκλίσεις μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών ενός γονιδίου δεν είναι ασυνήθιστες και μπορεί να οφείλονται σε μεταγραφικές ή/και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (Csárdi et al., 2015). Ωστόσο, δεδομένου ότι η λειτουργία των γονιδίων διαμεσολαβείται μέσω των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών, τα επίπεδα των πρωτεϊνών θεωρούνται πιο σημαντικά για τη λειτουργία των γονιδίων σε σχέση με τα επίπεδα του mRNA. Η παρατηρούμενη αδυναμία του Nrf2 να επάγει την έκφραση των γονιδίων CAT και NQO1 μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το μονοπάτι Nrf2 δεν επάγει πάντα τα ίδια γονίδια-στόχους σε κάθε κυτταρικό κύκλο (He et al., 2020; Malhotra et al., 2010)). Η μεταγραφική ρύθμιση μέσω του μονοπατιού Nrf2 εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την παρουσία συν-ρυθμιστών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, τη διαθεσιμότητα θέσεων σύνδεσης στους υποκινητές των γονιδίων στόχων και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση και άλλων οδών σηματοδότησής που οδηγούν σε ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο (He et al., 2020; Malhotra et al., 2010). Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης σχετικά με την αύξηση των SOD1 και GPX1 μετά από επεξεργασία των κυττάρων με HME συμφωνούν με μια προηγούμενη μελέτη που ανέφερε ότι η χορήγηση HME σε αρουραίους αύξησε τη δράση των SOD και GPX σε μαστικό ιστό και ερυθροκύτταρα (Balamurugan et al., 2017b). Επιπλέον, τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης είναι τα πρώτα που

δείχνουν αύξηση στις πρωτεΐνες GCLC, GSR, HMOX1 και TXN μετά από επεξεργασία των κυττάρων με HME.

Γενικότερα, η παρατηρούμενη αυξητική ρύθμιση των πρωτεϊνών GCLC, GSR, HMOX1, SOD1, TXN και GPX1 επιβεβαίωσε την προστασία που προσδίδει το εκχύλισμα HME στα WJ-MSCs κύτταρα έναντι του επαγόμενου εξωγενούς οξειδωτικού στρες. Το ένζυμο GCLC είναι το πρώτο ένζυμο το οποίο ρυθμίζει τον ρυθμό σύνθεσης της GSH, επομένως η αύξηση της έκφρασής του εξηγεί και τα αυξημένα επίπεδα της GSH που παρατηρήσαμε (Cassier-Chauvat et al., 2023). Τα αυξημένα επίπεδα της GSH ήταν σύμφωνα και με την αυξητική ρύθμιση του ενζύμου GPX1 το οποίο χρησιμοποιεί την GSH για να ανάγει το H_2O_2 σε νερό και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου $\bullet OH$ (Handy & Loscalzo, 2022). Η αύξηση της έκφρασης του GPX1 εξηγεί και τη μείωση των TBARS, καθώς το GPX1 καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδίων των λιπιδίων σε νερό με αποτέλεσμα να εμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Handy & Loscalzo, 2022). Επιπλέον η πιθανή αύξηση παραγωγής GSSG λόγω αυξημένης έκφρασης του GPX1 είναι σε συμφωνία με την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ενζύμου GSR το οποίο χρησιμοποιεί την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) για την αναγέννηση της γλουταθειόνης (Cassier-Chauvat et al., 2023). Όπως η GSH, έτσι και η TXN είναι μια ενδογενής πρωτεΐνη και αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του οξειδοαναγωγικού συστήματος της θειορεδοξίνης το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων (Oberacker et al., 2023). Συγκεκριμένα το ένζυμο TXN μπορεί να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες και να μειώσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την οξείδωση τους (Oberacker et al., 2023). Έτσι η αύξηση της πρωτεΐνης TXN εξηγεί τη μείωση του οξειδωτικού δείκτη CARB. Το ένζυμο TXN έχει αναφερθεί επίσης ότι συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA μέσω της ρύθμισης του από την πρωτεΐνη p53, επομένως η αύξηση του εξηγεί εν μέρει την προστασία που προσδίδει το εκχύλισμα HME έναντι των βλαβών του DNA (Kamal et al., 2016). Το ένζυμο HMOX1 εμφανίζει επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα καθώς η κατάλυση της αίμης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των αντιοξειδωτικών μορίων χολοπρασίνης και χολερυθρίνης, ενώ ταυτόχρονα διεγείρει την έκφραση της φερριτίνης ενός μορίου που δεσμεύει το σίδηρο αποτρέποντας των σχηματισμό ιόντων Fe^{2+} τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσω της αντίδρασης Fenton (Alonso-riñeiro et al., 2021). Τέλος, η SOD1 είναι επίσης ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο καταλύει την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο, αποτρέποντας έτσι τις βλάβες που προκαλούνται από το ανιόν σε κρίσιμα βιομόρια (Saxena et al., 2022).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα από το μακροφύκος *H. musciformis* προστάτευσε τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από την επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού στρες μειώνοντας τα επίπεδα των δεικτών TBARS, CARB και ROS, και αυξάνοντας τα επίπεδα της GSH. Επιπλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες του DNA που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες. Αποδείχθηκε επίσης ότι οι προστατευτικές ιδιότητες του HME έναντι του οξειδωτικού στρες οφείλονταν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 ο οποίος με την σειρά του αύξησε την έκφραση γονιδίων-στόχων του που κωδικοποιούν τις αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες GCLC, GSR, HMOX1, SOD1, TXN και GPX1. Αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν νέες πληροφορίες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μακροφύκου *H. musciformis* και θα συμβάλουν σημαντικά στην πιθανή χρήση του ως διατροφικό συμπλήρωμα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

6. Βιβλιογραφία

- Al-Himdani, S., Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., Combellack, E., Ibrahim, A., Doak, S. H., Hart, A. M., Archer, C. W., Thornton, C. A., & Whitaker, I. S. (2017). Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice. In *Frontiers in Surgery* (Vol. 4). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2017.00004>
- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., & Malki, M. I. (2020). DNA damage/repair management in cancers. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12041050>
- Alonso-piñeiro, J. A., Gonzalez-rovira, A., Sánchez-gomar, I., Moreno, J. A., & Durán-ruiz, M. C. (2021). Nrf2 and heme oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10091463>
- Alvarez, S., & Boveris, A. (2000). Antioxidant adaptive response of human mononuclear cells to UV-B: effect of lipoic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 55(2–3), 113–119. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00030-0)
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochsteint, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: A hypothesis (lipid peroxidation/ascorbic acid/primate evolution/erythrocyte aging). In *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (Vol. 78, Issue 11).
- Arner, E. S. J., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. In *European Journal of Biochemistry* (Vol. 267, Issue 20, pp. 6102–6109). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>
- Balamurugan, M., Sivakumar, K., Mariadoss, M. A. V., & Suresh, K. (2017a). Modulating effect of *Hypnea musciformis* (red seaweed) on lipid peroxidation, antioxidants and biotransforming enzymes in 7,12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinogenesis in experimental animals. *Pharmacognosy Research*, 9(1), 108–115. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.187085>
- Balamurugan, M., Sivakumar, K., Mariadoss, M. A. V., & Suresh, K. (2017b). Modulating effect of *Hypnea musciformis* (red seaweed) on lipid peroxidation, antioxidants and biotransforming enzymes in 7,12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinogenesis in experimental animals. *Pharmacognosy Research*, 9(1), 108–115. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.187085>
- banimohamad-shotorbani, B., Kahroba, H., Sadeghzadeh, H., Wilson, D. M., Maadi, H., Samadi, N., Hejazi, M. S., Farajpour, H., Onari, B. N., & Sadeghi, M. R. (2020). DNA damage repair response in mesenchymal stromal cells: From cellular senescence and aging to apoptosis and differentiation ability. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 62). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101125>
- Begolli, R., Chatziangelou, M., Samiotaki, M., Goutas, A., Barda, S., Goutzourelas, N., Kevrekidis, D. P., Malea, P., Trachana, V., Liu, M., Lin, X., Kollatos, N., Stagos, D., & Giakountis, A. (2023). Transcriptome and proteome analysis reveals the anti-cancer

- properties of *Hypnea musciformis* marine macroalga extract in liver and intestinal cancer cells. *Human Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s40246-023-00517-0>
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018a). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1865, Issue 5, pp. 721–733). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018b). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1865, Issue 5, pp. 721–733). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009a). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009b). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 5, pp. 3289–3303). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Cassier-Chauvat, C., Marceau, F., Farci, S., Ouchane, S., & Chauvat, F. (2023). The Glutathione System: A Journey from Cyanobacteria to Higher Eukaryotes. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox12061199>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. In *Kidney International Supplements* (Vol. 1, Issue 3, pp. 63–67). <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chakraborty, K., Joseph, D., Joy, M., & Raola, V. K. (2016). Characterization of substituted aryl meroterpenoids from red seaweed *Hypnea musciformis* as potential antioxidants. *Food Chemistry*, 212, 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.039>
- Ci Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (n.d.). *Iron toxicity and oxygen radicals*.
- Csárdi, G., Franks, A., Choi, D. S., Airolidi, E. M., & Drummond, D. A. (2015). Accounting for Experimental Noise Reveals That mRNA Levels, Amplified by Post-Transcriptional Processes, Largely Determine Steady-State Protein Levels in Yeast. *PLoS Genetics*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005206>
- Cuadrado, A. (2015). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/β-TrCP. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 88, Issue Part B, pp. 147–157). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029>
- Cullinan, S. B., Gordan, J. D., Jin, J., Harper, J. W., & Diehl, J. A. (2004). The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8477–8486. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.19.8477-8486.2004>
- das Chagas Faustino Alves, M. G., Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G., do Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Soriano, E. M., Benevides, N. M. B., & Leite, E. L. (2012). Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea*

- musciiformis. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1217–1227.
<https://doi.org/10.1007/s10811-011-9763-3>
- De Brito, T. V., Prudêncio, R. D. S., Sales, A. B., Vieira Júnior, F. D. C., Candeira, S. J. N., Franco, Á. X., Aragão, K. S., Ribeiro, R. D. A., Ponte De Souza, M. H. L., Chaves, L. D. S., Freitas, A. L. P., Medeiros, J. V. R., & Dos Reis Barbosa, A. L. (2013). Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciiformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5), 724–733.
<https://doi.org/10.1111/jphp.12024>
- de Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. In *Stem Cell Reviews and Reports* (Vol. 6, Issue 4, pp. 633–649). <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 5, pp. 3217–3266). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issues 1–2, pp. 86–98). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation*, 20(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 482, Issue 3, pp. 419–425). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Haddad Mohamed, Herve Vincent, Raafet Ben Khedher Mohamed, Rabanel Jean- Michel, & Ramassamy Charles. (2021). An Old and Small Molecule with Great Functions and New Applications in the Brain and in Alzheimer's Disease . *Antioxid Redox Signal*, 270–292.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990a). The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. In *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (Vol. 280, Issue 1).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990b). The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. In *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (Vol. 280, Issue 1).
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2022). The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 188, pp. 146–161). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 13, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Healy, L. E., Zhu, X., Pojić, M., Sullivan, C., Tiwari, U., Curtin, J., & Tiwari, B. K. (2023). Biomolecules from Macroalgae—Nutritional Profile and Bioactives for Novel Food Product Development. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom13020386>

- Ilic, D., & Polak, J. M. (2011). Stem cells in regenerative medicine: Introduction: In *British Medical Bulletin* (Vol. 98, Issue 1, pp. 117–126). <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr012>
- Jones, R., Lebkowski, J., & Mcniece, I. (2010). *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt>
- Kamal, A. M., Hamdy, N. M., Hegab, H. M., & El-Mesallamy, H. O. (2016). Expression of thioredoxin-1 (TXN) and its relation with oxidative DNA damage and treatment outcome in adult AML and ALL: A comparative study. *Hematology*, 21(10), 567–575. <https://doi.org/10.1080/10245332.2016.1173341>
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Ucan, D., & Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
- Karlenius, T. C., & Tonissen, K. F. (2010). Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. In *Cancers* (Vol. 2, Issue 2, pp. 209–232). <https://doi.org/10.3390/cancers2020209>
- Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., & Höhn, A. (2021). Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. In *Redox Biology* (Vol. 42). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>
- Keum, Y. S., & Choi, B. Y. (2014). Molecular and chemical regulation of the keap1-Nrf2 signaling pathway. In *Molecules* (Vol. 19, Issue 7, pp. 10074–10089). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules190710074>
- Kikuchi, G., Yoshida, T., & Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 338, Issue 1, pp. 558–567). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.020>
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Dini, G., Egeler, M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., & Ringdén, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. In *www.thelancet.com* (Vol. 371). www.thelancet.com
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 53, pp. 401–426). <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Mah, L.-J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>
- Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W., & Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>
- Mathur, A., Pandey, V. K., & Kakkar, P. (2018). Activation of GSK3 β /TrCP axis via PHLPP1 exacerbates Nrf2 degradation leading to impairment in cell survival pathway during diabetic nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.550>

- Morse, D., & Choi, A. M. K. (2005). Heme oxygenase-1: From bench to bedside. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 172, Issue 6, pp. 660–670). <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-465SO>
- Motohashi, H., O'connor, T., Katsuoka, F., Douglas Engel, J., & Yamamoto, M. (n.d.). *Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors*. www.elsevier.com/locate/gene
- Oberacker, T., Kraft, L., Schanz, M., Latus, J., & Schricker, S. (2023). The Importance of Thioredoxin-1 in Health and Disease. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox12051078>
- Pal, D. K., Ferrie, C., Addis, L., Akiyama, T., Capovilla, G., Caraballo, R., De Saint-Martin, A., Fejerman, N., Guerrini, R., Hamandi, K., Helbig, I., Ioannides, A. A., Kobayashi, K., Lal, D., Lesca, G., Muhle, H., Neubauer, B. A., Pisano, T., Rudolf, G., ... Koutroumanidis, M. (2016). Idiopathic focal epilepsies: The lost tribe. In *Epileptic Disorders* (Vol. 18, Issue 3, pp. 252–288). John Libbey Eurotext. <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0839>
- Papsdorf, K., & Brunet, A. (2019). Linking Lipid Metabolism to Chromatin Regulation in Aging. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 97–116). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.004>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, pp. 55–74). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pócsi, I., Prade, R. A., & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 49, pp. 1–76). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
- Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (1999). *Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism*. <http://www.idealibrary.com>
- Reddy, S. P. (n.d.). *The Antioxidant Response Element and Oxidative Stress Modifiers in Airway Diseases*.
- Rice-Evans, C. A., & Diplock, A. T. (1993). CURRENT STATUS OF ANTIOXIDANT THERAPY. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 15).
- Ross, D., & Siegel, D. (2021). The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. In *Redox Biology* (Vol. 41). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101950>
- Rozo, G., Rozo, C., Puyana, M., Ramos, F. A., Almonacid, C., & Castro, H. (2019). Two compounds of the Colombian algae *Hypnea musciformis* prevent oxidative damage in human low density lipoproteins LDLs. *Journal of Functional Foods*, 60, 103399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.06.001>
- Saxena, P., Selvaraj, K., Khare, S. K., & Chaudhary, N. (2022). Superoxide dismutase as multipotent therapeutic antioxidant enzyme: Role in human diseases. In *Biotechnology Letters* (Vol. 44, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03200-3>
- Sea, K., Sohn, S. H., Durazo, A., Sheng, Y., Shaw, B. F., Cao, X., Taylor, A. B., Whitson, L. J., Holloway, S. P., Hart, P. J., Cabelli, D. E., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (2015). Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase.

- Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2405–2418.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588798>
- Siddiqui, M. S., François, M., Fenech, M. F., & Leifert, W. R. (2015). Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 766, pp. 1–19). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.001>
- Silva-Islas, C. A., & Maldonado, P. D. (2018). Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. In *Pharmacological Research* (Vol. 134, pp. 92–99). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>
- Souza, R. B., Frota, A. F., Silva, J., Alves, C., Neugebauer, A. Z., Pinteus, S., Rodrigues, J. A. G., Cordeiro, E. M. S., de Almeida, R. R., Pedrosa, R., & Benevides, N. M. B. (2018). In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 1248–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.029>
- Stephanie Panier, & Simon J Boulton. (2013). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus . *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 7–18.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 29, Issue 17, pp. 1727–1745). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- V. Brito, T., Barros, F. C. N., Silva, R. O., Dias Júnior, G. J., José, J. S., Franco, Á. X., Soares, P. M. G., Chaves, L. S., Abreu, C. M. W. S., de Paula, R. C. M., Souza, M. H. L. P., Freitas, A. L. P., & André, A. L. (2016). Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. *Carbohydrate Polymers*, 151, 957–964. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.047>
- Vatan O., Celicler S., & Yildiz G. (2011). In vitro antigenotoxic and anti-oxidative capacity of *Hypnea murciformis* (Wulfen) Lamouroux extract in human lymphocytes. *Afr J Biotechnol*, 484–490.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. In *J Clin Pathol* (Vol. 54). www.jclinpath.com
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>