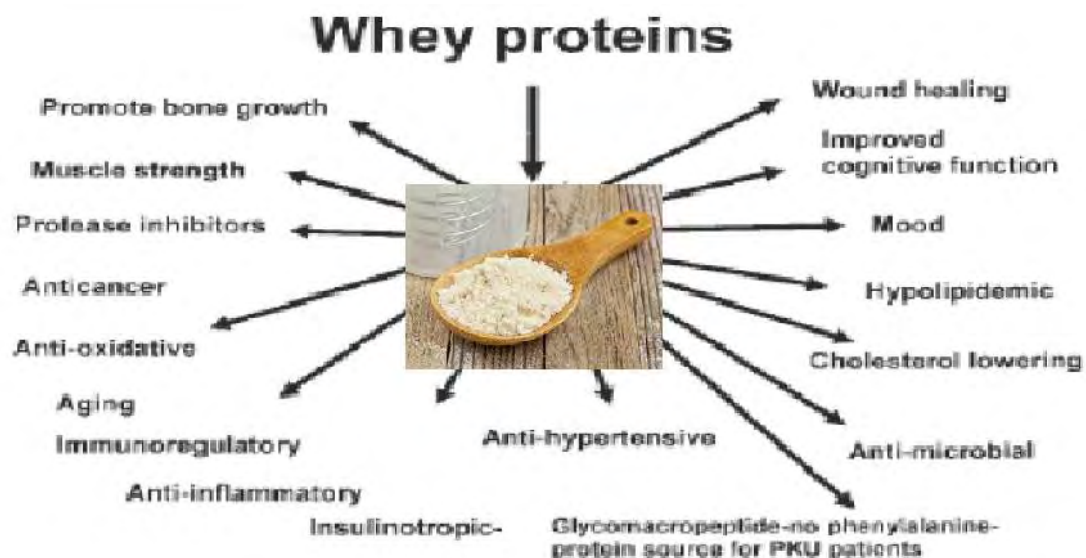




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**«Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης
τυρογάλακτος σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926»**



ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΕΩΡΓΑΤΖΗ
ΓΕΩΠΙΟΝΟΣ ΓΠΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2013

«Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926»

«Determination of antioxidant activity of whey protein on endothelial cells EA.hy 926»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (Επιβλέπων): Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Λεωνίδας: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα χαρακτηριστικά για την ολοκλήρωση μιας έρευνας είναι η οργάνωση, η υπομονή και η διαρκής μελέτη τόσο κατά τη συλλογή των στοιχείων όσο και κατά τη διάρκεια της πειραματικής πορείας. Όλα αυτά όμως μπορεί να μην καρποφορήσουν εάν δεν υπάρχει η ψυχολογική συμπαράσταση, η στήριξη και η ευθάρρυνση από τα αγαπημένα μας πρόσωπα.

Η παρούσα μελέτη δεν θα ολοκληρωνόταν χωρίς την αμέριστη και καθοριστική παρουσία, βοήθεια και συμπαράσταση του Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών κ. Δημήτριου Στάγκου, ο οποίος ήταν παρόν σε όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής αλλά και της βιβλιογραφικής έρευνας δείχνοντας κατανόηση και υπομονή όσο απαιτητική και αν ήταν η εργασία θυσιάζοντας ακόμη και από τον προσωπικό του χρόνο, καθώς και για την προσωπική του εργασία στο ιδιαίτερα απαιτητικό κομμάτι της ανάγνωσης και της διόρθωσης της μελέτης. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα άλλα δυο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, του κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτή την μελέτη στο εργαστήριό του, βοηθώντας με να αποκτήσω νέες, πολύτιμες γνώσεις. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Δημήτριο Λεωνίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, οι οποίοι ήταν παρόντες στα μικρά αλλά και στα μεγαλύτερα καθημερινά προβλήματα και με βοήθησαν στην επίλυση τους. Περισσότερο όμως θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα κα. Θάλεια Κερασιώτη για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια της, τις παρατηρήσεις αλλά κυρίως για την υπομονή που έδειξε στο πρόσωπο μου κατά την διάρκεια της πειραματικής πορείας αλλά και για τα ευχάριστα διαλείμματα που βοηθούσαν στη χαλάρωση και στην τόνωση του ηθικού.

Τέλος, αλλά όχι τελευταίους θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Νικόλαο και Κωνσταντινιά, οι οποίοι πίστεψαν σε μένα και στις δυνατότητες μου και με ευθάρρυναν να συνεχίσω βοηθώντας με, με κάθε μέσο που μπορούσαν να

διαθέσουν ψυχολογικό, ηθικό αλλά και οικονομικό για την ολοκλήρωση του κύκλου σπουδών μου, η οποία περατώνεται με την παρούσα μελέτη.

Το πτυχίο μου αφιερώνεται σε εκείνους, με την υπόσχεση ότι θα το χρησιμοποιήσω όσο καλύτερα μπορώ προς αναγνώριση των κόπων και των θυσιών που έκαναν για μένα.

Γεωργατζή Βασιλική

Γεωπόνος ΓΠΑ

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
1.Α Περιεχόμενα Εικόνων	8
1.Β Περιεχόμενα Γραφημάτων	9
1.Γ Περίληψη	11
Abstract	13
2. Εισαγωγή	15
2.1 Η προέλευση, ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης των δραστικών μορφών του οξυγόνου (ROS)	15
2.2 Η παραγωγή ελευθέρων ριζών σε βάρος των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και οι ευεργετικές ή επιβλαβείς επιδράσεις που έχει στον οργανισμό	17
2.2.1 Οι ευεργετικές επιδράσεις της παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό	18
2.2.2 Οι επιβλαβείς επιδράσεις της παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό	19
2.2.2.α. Η οξείδωση των λιπιδίων	19
2.2.2.β. Η καταστροφή των πρωτεϊνών	19
2.2.2.γ. Η καταστροφή του DNA	20
2.3 Ο αμυντικός μηχανισμός που διαθέτει ο οργανισμός για την εξουδετέρωση ή/και την απομάκρυνση των ROS	21
2.3.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού ...	22
2.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού	23
2.4 Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος (cheese – whey protein)	26
2.5 Ο «άνθρακας» της βιομηχανίας παρασκευής τυριού που μετατράπηκε σε «χρυσό», ενσωματώθηκε και αξιοποιήθηκε στη διατροφή και στην επεξεργασία τροφίμων	28
3. Σκοπός Πειράματος	30
4. Υλικά και Μέθοδοι	30
4Α. ΥΛΙΚΑ	30
4.1 Χημικά αντιδραστήρια	30

4.1.2 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος.....	30
4.1.3 Κυτταρική σειρά EA.hy 926	31
4B. Μέθοδοι.....	32
4.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926	32
4.2.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο ΧΤΤ	33
4.2.2α Αρχή μεθόδου	33
4.2.2β Πειραματική διαδικασία.....	34
4.2.3 Κυτταρομετρία Ροής	35
4.2.4 Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP.....	39
4.2.5 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)	40
4.2.5α Πειραματική διαδικασία.....	40
4.2.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS	41
4.2.6α Αρχή μεθόδου	41
4.2.6β Πειραματική διαδικασία.....	42
4.2.6.γ. Υπολογισμοί	42
4.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	43
4.2.8 Στατιστική ανάλυση	44
5. Αποτελέσματα.....	45
5.1 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ.....	45
5.2 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής	46
5.3 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής ..	50
5.4 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS).....	53
6. Συζήτηση	55
7. Βιβλιογραφία.....	62

1.A Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Ο μηχανισμός δράσης των ROS μέσα στο κύτταρο.

Εικόνα 2: Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό.

Εικόνα 3: Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού για την απομάκρυνση των ROS/RNS. Τα κύρια ένζυμα απομάκρυνσης των ROS εμφανίζονται με μπλε χρώμα και τα αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους ταξινομούνται με βάση τον υδρόφιλο/λιπόφιλο χαρακτήρα τους.

Εικόνα 4: Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926.

Εικόνα 5: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζίνη από ζωντανά κύτταρα.

Εικόνα 6: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer, β) 96-well plate.

Εικόνα 7: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Εικόνα 8: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.

Εικόνα 9: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη γλουταθειόνη, τις ελεύθερες ρίζες και τα TBARS στα κύτταρα EA.hy 926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της πρωτεΐνης και του t-BHP. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

Εικόνα 10: Αντίδραση του TBA με την MDA.

1.Β Περιεχόμενα Γραφημάτων

Γράφημα 1: Η % βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 υπό την επίδραση της πρωτεΐνη τυρογάλακτος.

Γράφημα 2: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 h. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (P<0.05). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BHP (P<0.05).

Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BHP.

Γράφημα 5: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 h. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BHP (P<0.05).

Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά

EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BHP.

Γράφημα 8: Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BPH (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 h. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (P<0.05).* Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BPH (P<0.05).

1.Γ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε ενδοθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy 926), όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και τα επίπεδα των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS). Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της μεθόδου XTT διαπιστώθηκε πως στις διάφορες συγκεντρώσεις (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) που χρησιμοποιήθηκαν η πρωτεΐνη τυρογάλακτος δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση. Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της GSH, όπου τα κύτταρα μετά από επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP παρουσίασαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 28.6 % συγκριτικά με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα GSH κατά 40.5 %, 43.7 %, 54.3 %, 56.19 %, 82.6 %, 141 % και 95.5 % σε σχέση με τα δείγματα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.

Ακόμη, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ROS, όπου μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν συγκριτικά με το control. Στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ROS κατά 11.58 %, 20.18 %, 24.6 %, 32.6 %, 57.83 %, 58.54 % και 24.37 % συγκριτικά με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.

Η τελευταία μέθοδος που πραγματοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης). Η χορήγηση του t-BHP αύξησε τα TBARS κατά 19% σε σχέση με το control, ενώ η χορήγηση της πρωτεΐνης μείωσε τα αυξημένα τους

επίπεδα μετά τη χορήγηση του t-BHP κατά 37%, 47%, 43%, 39%, 40%, 48% και 53% για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.

Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ακόμη περισσότερο ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται αυτή η δράση.

ABSTRACT

In the present study, it was determined the antioxidant activity of whey protein in endothelial cells (cell line EA.hy 926), in which the levels of glutathione (GSH) and free radicals (ROS) were determined with the method of flow cytometry as well as the levels of reactive substances of thiobarbituric acid (TBARS) were assessed spectrophotometrically. More specifically, using the XTT method, it was found that in various concentrations (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg / ml), whey protein showed no cytotoxic activity. Using flow cytometry, the GSH levels were determined in the cells. Specifically, after incubation with the oxidizing agent t-BHP, the cells exhibited significantly reduced levels of glutathione by 28.6% compared to control, whereas in the samples that were incubated with t-BHP and whey protein, there were elevated GSH levels by 40.5%, 43.7%, 54.3%, 56.19%, 82.6%, 141% and 95.5% compared to the samples that was administered only t-BHP at concentrations of 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg / ml respectively.

Also, flow cytometry was used to determine the ROS levels. After administration of t-BHP, ROS levels were not affected compared to control. However, in the samples that were treated with whey protein, ROS levels decreased by 11.58%, 20.18%, 24.6%, 32.6%, 57.83%, 58.54% and 24.37%, compared to the levels of ROS after administration of t-BHP at concentrations of 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml respectively.

Finally, the levels of TBARS (marker of lipid peroxidation) were determined spectrophotometrically. The administration of t-BHP increased TBARS by 19% compared to control, while the administration of the protein reduced the elevated levels after the administration of t-BHP by 37%, 47%, 43%, 39%, 40%, 48% and 53% at concentrations of 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml respectively.

In conclusion, the results showed that whey protein has antioxidant activity, but further studies are needed to elucidate the mechanism through which this action is exerted.

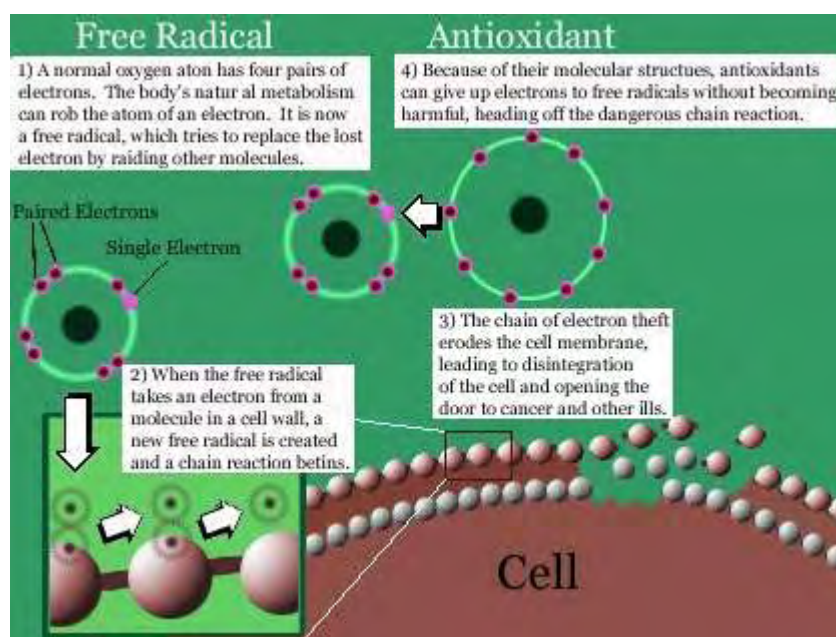
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Η προέλευση, ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης των δραστικών μορφών του οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS) μπορεί να είναι ουδέτερα μόρια (υπεροξειδίο του υδρογόνου - H_2O_2), ανιόντα (ανιόν σουπεροξειδίου - O_2^-) ή ρίζες (ρίζα υδροξυλίου - $OH\cdot$), οι οποίες λόγω της δραστικότητάς τους μπορούν να μεταβούν από τη μια μορφή στην άλλη. Η μετάβαση αυτή λαμβάνει χώρα με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το μοριακό οξυγόνο που οδηγεί στο σχηματισμό σουπεροξειδίου (O_2^-), το οποίο ανάγεται είτε αυθόρμητα είτε καταλύεται με τη βοήθεια της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) με αποτέλεσμα να διαπερνά ευκολότερα την κυτταρική μεμβράνη, έχοντας μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε αντίθεση με το σουπεροξειδίο [Channon and Guzik, 2002]. Αντίστοιχα υπάρχουν οι δραστικές μορφές του αζώτου (RNS) όπου περιλαμβάνονται ενώσεις που σχηματίζονται με τη συμμετοχή του αζώτου ($NO\cdot$, $NO_2\cdot$, $ONOO\cdot$) και οι δραστικές μορφές του χλωρίου (RSS) όπου περιλαμβάνονται ενώσεις που σχηματίζονται με τη συμμετοχή του χλωρίου ($HOCl$). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο σχηματισμός των οικογενειών αυτών των δραστικών μορφών μπορεί να προκύψει μετά από αντίδραση με τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ή να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή τους. Ακόμη, το σουπεροξιδίο (O_2^-) ή το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) αντιδρώντας με ένα ιόν μετάλλου, με συνηθέστερο μέταλλο στα βιολογικά συστήματα να είναι ο σίδηρος, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ρίζας υδροξυλίου ($OH\cdot$) (αντίδραση Haber - Weiss) [Mylonas and Kouretas, 1999].

Ωστόσο, όλες οι μορφές των ROS περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια ή ασταθείς δεσμούς καθιστώντας τες μόρια με υψηλή δραστικότητα, που σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν εύκολα να αντιδράσουν με πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας μη αναστρέψιμες μεταβολές στη λειτουργία του κυττάρου ή ακόμη και

πλήρη καταστροφή του [Magder, 2006], ενώ παράλληλα ενοχοποιούνται πως αποτελούν τη μοριακή βάση ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών (όπως ο καρκίνος [Federico et al., 2007; Cook et al., 2004], οι καρδιαγγειακές παθήσεις [Singal et al., 2000], το AIDS [Israël and Gougerot –Pocidallo, 1997] κ.α.), ιδιαίτερα νευροεκφυλιστικών [Halliwell, 2001].



Εικόνα 1: Ο μηχανισμός δράσης των ROS μέσα στο κύτταρο.

Παρόλα αυτά, η ελεγχόμενη παραγωγή των ROS συμμετέχει στον βασικό μηχανισμό της κυτταρικής σηματοδότησης, διατηρώντας έτσι την ομοιόσταση του κυττάρου, αφού οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν υιοθετήσει μηχανισμούς για να επωφελούνται από τη συνύπαρξη τους. Αν και οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στη βιολογία του κυττάρου έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, τόσο οι πηγές τους όσο και οι μηχανισμοί δράσης τους δεν έχουν διευκρινιστεί.

2.2 Η παραγωγή ελευθέρων ριζών σε βάρος των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και οι ευεργετικές ή επιβλαβείς επιδράσεις που έχει στον οργανισμό

Οι ROS βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, που καθορίζονται από την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού παραγωγής τους και του ποσοστού αποβολής τους από τα αντιοξειδωτικά συστήματα που διαθέτει ο οργανισμός [Gutteridge and Halliwell, 1989]. Όμως, αυτή η οξειδοαναγωγική ισορροπία (ο λόγος αντιοξειδωτικών/προοξειδωτικών) μπορεί να διαταραχθεί είτε με την υπερβολική παραγωγή των ROS (ενδεικτικά μπορεί να λάβει χώρα σε περιπτώσεις όπως η γήρανση του οργανισμού [Briganti and Picardo, 2003] ή κατά την αθηροσκλήρωση [Lönn et al., 2012]), είτε λόγω της μειωμένης απόδοσης των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού (ενδεικτικά μπορεί να λάβει χώρα σε καταστάσεις παχυσαρκίας [Salvin and Lloyd, 2012], σε άτομα που καπνίζουν [Armstrong et al., 2011], σε άτομα που αντιμετωπίζουν προβλήματα με το αλκοόλ [Albano, 2006]), μια κατάσταση γνωστή ως οξειδωτικό στρες.

Ωστόσο, αυτή η διαταραχή μπορεί να πραγματοποιηθεί ελεγχόμενα εξαιτίας της ενεργοποίησης των μηχανισμών που παράγουν τις ROS και παροδικά η απόκριση των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού να είναι αποτελεσματική, αντισταθμίζοντας αυτή την διαταραχή και καθιστώντας την βιώσιμη. Αντιθέτως, σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις (όπως ο καρκίνος) η απόκριση των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού είναι ανεπαρκής, εξαιτίας της αυξημένης και κυρίως παρατεταμένης παραγωγής των ROS. Η διαταραχή αυτή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μπορεί να προκληθεί από πλήθος παραγόντων όπως εξωγενής καταπόνηση (περιβαλλοντικοί παράγοντες και προοξειδωτικά), τοξικότητα από βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία, μειωμένη πρόσληψη ή έλλειψη αντιοξειδωτικών που μπορούν να ληφθούν μέσω των τροφών, ακόμη και λόγω ανωμαλιών του γενετικού υλικού του οργανισμού.

Τα παραπάνω καταδεικνύουν τον διπλό ρόλο που κατέχουν οι ROS στη βιολογία του κυττάρου, διότι αφενός μεν μπορούν δυνητικά να αποτελούν τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού και αφετέρου να αποτελούν σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση. Γεγονός, που εξηγείται από τη διαφορετική χημική φύση των ROS, τα επίπεδα παραγωγής τους ή ακόμη σε ποιο σημείο /οργανίδιο του κυττάρου γίνεται η παραγωγή τους και τέλος από την ποικιλία των κυτταρικών αποκρίσεων [Lenaz et al., 1999; Orrenius, 2007].

2.2.1 Οι ευεργετικές επιδράσεις της παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό

Οι ROS φαίνεται πως σχετίζονται με το σύστημα ανοσίας του οργανισμού, κυρίως δρώντας εναντίον των αντιγόνων κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης [Kanter, 1998; Cheng et al., 2002; Lee et al., 2008], ένας ρόλος που αυξάνεται σημαντικά όταν λαμβάνει χώρα η φλεγμονή προκαλούμενη κυρίως από την έντονη άσκηση ή από τραυματισμούς λόγω έκκεντρης άσκησης [Peake et al., 2005]. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στις επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό, αν και οι ROS διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στην τροποποίηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Ακόμη διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο ενεργοποιώντας διάφορα ένζυμα, στην αποτοξίνωση του οργανισμού, διευκολύνοντας την αναπλήρωση του γλυκογόνου και τέλος στη μυϊκή συστολή όπου όταν αναστέλλεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται απώλεια της μυϊκής συστολής, ενώ αντίθετα όταν αυξάνεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται η εμφάνιση μυϊκής κόπωσης [Lännergren et al., 1996; Plant et al., 2001; Zhang et al., 2006]

2.2.2 Οι επιβλαβείς επιδράσεις της παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό

Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό λαμβάνουν χώρα επειδή οι ROS έχουν την ικανότητα να τροποποιούν το μέγεθος και το σχήμα των ενώσεων με τις οποίες έρχονται σε αλληλεπίδραση, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης των υγιών κυττάρων, να προκαλούνται καταστάσεις φλεγμονής και να αλλοιώνονται οι λειτουργίες του κυττάρου.

2.2.2.α. Η οξείδωση των λιπιδίων

Οι ROS διαθέτουν την ικανότητα να προκαλούν την οξείδωση των ελεύθερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία συγκροτούν τη μεμβράνη του κυττάρου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μηχανισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, ένας αλυσιδωτός μηχανισμός που οδηγεί στην παραγωγή και άλλων ελευθέρων ριζών όπως οι ROO· ή ROOH·. Κατά συνέπεια λόγω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων προκαλείται αλλαγή στη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειωμένη ικανότητα να διατηρηθεί το ποσοστό της συγκέντρωσης σε μια εξισορροπημένη κατάσταση, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης που είναι πλέον πιο ευαίσθητη απέναντι σε καταστάσεις φλεγμονής. Για αυτό το λόγο, μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια που σχετίζεται με τα ενδοκυτταρικά υγρά, αλλαγή στην ομοιόσταση του ασβεστίου εξαιτίας της μειωμένης μεταφοράς του στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τέλος, αλλαγή στις λειτουργίες των μιτοχονδρίων [Powers and Lennon, 1999; McArdle et al., 2002; Cooper et al., 2002; Horton, 2003; Zhang et al., 2006].

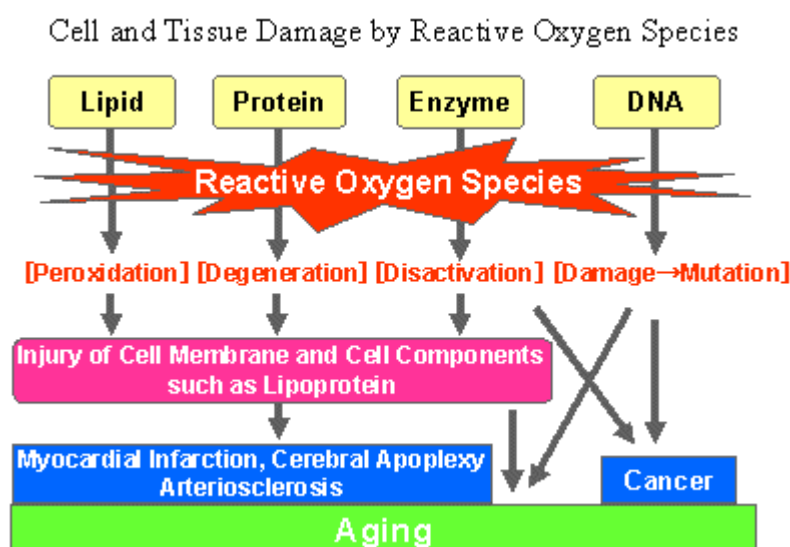
2.2.2.β. Η καταστροφή των πρωτεϊνών

Η καταστροφή των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει συνδυαστικά από την παραγωγή των ROS και την αλληλεπίδραση τους με τα μεταλλικά ιόντα του σιδήρου (Fe) και του χαλκού (Cu). Έρευνες έχουν δείξει πως

μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξειδωτική βλάβη εμφανίζουν τα αμινοξέα λυσίνη, προλίνη, ιστιδίνη, αργινίνη, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα των καρβονυλίων στις πρωτεΐνες, ποσοστό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογηθεί το μέγεθος της οξειδωτικής καταπόνησης του οργανισμού. Ακόμη, λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης παρατηρείται ταχεία απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας πολλών πρωτεϊνών, όπως και αδρανοποίηση της συνθετάσης της γλουταθειόνης [Berlett and Stadtman, 1997; Requena et al., 2003].

2.2.2.γ. Η καταστροφή του DNA

Η αλληλεπίδραση των ROS με το DNA είναι ικανή να προκαλέσει καταστροφές, (διότι κάθε μέρος του DNA είναι ευαίσθητο στην έκθεση του στις ROS) που περιλαμβάνουν θραύσεις του, τροποποίηση βάσεων, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεσοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Παρόλο που το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA είναι συνεχές, οι τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν από τις ROS έχουν ως συνέπεια την οξείδωση του DNA που οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα πρόκλησης καρκίνου στον ανθρώπινο οργανισμό και γήρανσης των κυττάρων [Aoi et al., 2004 ; Urso et al., 2003; Dizdaroglu, 2005].



Εικόνα 2: Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό.

2.3 Ο αμυντικός μηχανισμός που διαθέτει ο οργανισμός για την εξουδετέρωση ή/και την απομάκρυνση των ROS

Ένα από τα χαρακτηριστικά των κυττάρων των ζωντανών οργανισμών είναι η ικανότητα τους να μπορούν να επιδιορθώνουν τις βλάβες που μπορεί να προκύψουν σε διάφορα στάδια κάποιων διαδικασιών, αφού είναι εξοπλισμένα με τους κατάλληλους μηχανισμούς, με αποτέλεσμα τα κατεστραμμένα μόρια (ειδικά οι πρωτεΐνες) να αναγνωρίζονται από τα συστήματα αποικοδόμησης του κυττάρου και εκείνες που είναι εκτενώς ουβικιτινωμένες λόγω οξειδωτικής τροποποίησης που μπορεί να έχουν υποστεί, κατευθύνονται στο πρωτεάσωμα για να πεπτούν πλήρως. Ωστόσο, υπάρχει το ενδεχόμενο το πρωτεάσωμα να μην καταφέρει να αφομοιώσει κάποιες πρωτεΐνες ή να συσσωρευτούν αδιάλυτα συσσωματώματα και να προκληθούν ριζικές αλλαγές στις λειτουργίες του κυττάρου [Knight, 2000; Grune et al., 2001; Geanacopoulos, 2004].

Αξίζει να σημειωθεί πως τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ROS, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες υφίστανται ιδιαίτερα έντονη οξειδωτική τροποποίηση, καταδεικνύεται πως η απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του συγκεκριμένου οργανιδίου. Ταυτόχρονα, η δυνατότητα αντιστροφής της οξείδωσης των πρωτεϊνών μέσω ενζυμικών μηχανισμών του κυττάρου, όπως και η αποδόμηση των πρωτεϊνών αποτελούν ζωτικής σημασίας διαδικασίες για να διατηρηθεί η ομοιόσταση των πρωτεϊνών.

Έτσι, όλα τα μόρια που περιέχονται στο κύτταρο και έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ή να απομακρύνουν τις ROS περιλαμβάνονται στον όρο αντιοξειδωτικά. Στα μόρια αυτά περιλαμβάνονται αντιοξειδωτικά ένζυμα που μετατρέπουν τις ROS σε λιγότερο τοξικά μόρια και αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μεγέθους που μπορεί να προέλθουν είτε ως ενδογενή προϊόντα του μεταβολισμού, ως συμπαραγόντες είτε ως εξωγενή προϊόντα που μπορούν να ληφθούν μέσω της διατροφής. Ορισμένα από αυτά τα μόρια έχουν την ικανότητα να

αναγεννήσουν άλλα αντιοξειδωτικά με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας εκτενής και αυτοτροφοδοτούμενος αμυντικός μηχανισμός [Natella et al., 2002; Ursini and Sevanian, 2002; Reboul et al., 2007].

2.3.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού

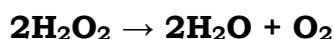
Πιο συγκεκριμένα οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τον **πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα Nrf2**, που ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων [Kobayashi and Yamamoto, 2005 Jung and Kwak, 2010].

Την **υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)** που συμμετέχει στην κατάλυση της αντίδρασης μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 .



Στον άνθρωπο απαντάται σε τρεις ισομορφές : α) την Cu-SOD που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, β) την Mn-SOD που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και γ) την Cu,Zn-SOD που εντοπίζεται στο εξωκυττάριο υγρό, που οι διαφορές τους έγκειται στη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, στη σύνθεση και στον αριθμό των υπομονάδων των αμινοξέων τους και στους συμπαραγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν. Είναι απαραίτητη η συνεργασία της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) με άλλα ένζυμα για να εξουδετερωθεί πλήρως το H_2O_2 διότι η συσσώρευση του, παρουσία κάποιου μετάλλου μετάπτωσης θα οδηγήσει στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου (αντίδραση Fenton) [Zelko et al., 2002].

Την **καταλάση (CAT)**, που αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά συστήματα απομάκρυνσης του H_2O_2 και απαντάται στα υπεροξειδωσώματα [Matés, 2000].



Τα **ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης**, που συμμετέχουν σε βιοχημικές αντιδράσεις κατάλυσης της μεταβολικής

οδού της φωσφορικής πεντόζης, της κατ' εξοχήν πηγής NADPH εντός του κυττάρου.

Την **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**, που απαντάται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και στο εξωτερικό του κυττάρου και εμφανίζεται σε αφθονία σε συγκεκριμένα όργανα όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση μετατροπής των υδροϋπεροξειδίων (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και συμμετέχει στην αναγωγή του H₂O₂ σε νερό, και παράλληλα βοηθά στην οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



Την **αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)**, που ευθύνεται στο να ανάγει τη GSSG σε GSH και κατά συνέπεια διατηρεί την αναλογία GSSG/GSH σε φυσιολογικές τιμές στο εσωτερικό του κυττάρου.

Την **υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και την αναγωγή της θειορεδοξίνης**, που η πρώτη με τη βοήθεια της δεύτερης, της θειορεδοξίνης και της NADPH βοηθούν στην αναγωγή του H₂O₂ και των αλκυλ-υδροϋπεροξειδίων.

2.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού

Κάποια από τα μόρια που ανήκουν σε αυτό τον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού, είναι υδατοδιαλυτά και ασκούν τη δράση τους στο πλάσμα ή στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου, άλλα είναι λιποδιαλυτά και ασκούν τη δράση τους εντός των μεμβρανών, ενώ υπάρχουν και αμφιπαθητικά μόρια. Μετά από τη συνεργασία της **βιταμίνης C** (υδατοδιαλυτή - ασκορβικό οξύ) με τη **βιταμίνη E** (λιποδιαλυτή) αναγεννάται η α-τοκοφερόλη από την παραχθείσα ρίζα της τοκοφερόλης (tocopheroxyl) που προκύπτει μέσω της διαδικασίας απομάκρυνσης των ROS από την βιταμίνη E. Όμως, υπάρχει και το ενδεχόμενο σε υπερβολικές τιμές η βιταμίνη C να δρα ως προοξειδωτικό,

ενώ έχει αποδειχθεί πως σε φυσιολογικές τιμές δρα πάντα ως οξειδωτικό, ακόμη και όταν είναι παρόντα στα βιολογικά συστήματα και μεταλλικά ιόντα [Dröge, 2002].

Η **βιταμίνη E**, η οποία είναι από τα πιο σημαντικά λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά που απαντάται στις κυτταρικές μεμβράνες, περιλαμβάνει οκτώ διαφορετικά παράγωγα, εκ των οποίων η α-τοκοφερόλη είναι το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό στον ανθρώπινο οργανισμό. Η σημαντικότητα έγκειται στο γεγονός ότι απαντάται σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να σχετίζεται με το λιπιδικό τους περιεχόμενο και κυρίως εμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων, αν και σε υπερβολικές τιμές μπορεί να δράσει ως προοξειδωτικό [Dröge, 2002].

Το **συνένζυμο Q10** (ουβικινόνη), αποτελεί έναν σημαντικό φορέα ηλεκτρονίων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, απαντάται όμως και σε λιποπρωτεΐνες ορού όπως και στις μεμβράνες του πλάσματος [Dallner et al., 2003]. Η χημική σύσταση του συνενζύμου Q περιλαμβάνει ένα κινολινικό δακτύλιο που ενώνεται με μια ισοπρενοειδή πλευρική αλυσίδα, ο αριθμός των οποίων είναι χαρακτηριστικός για κάθε είδος οργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί πως η σύνθεση του συνενζύμου Q γίνεται μόνο στα θηλαστικά, μια πολύπλοκη διαδικασία που για την πραγματοποίηση της συμμετέχουν τουλάχιστον οκτώ γονίδια.

Η **γλουταθειόνη**, πρόκειται για ένα τριπεπτιδίο που διαθέτει τόσο αναγωγικά όσο και νουκλεόφιλα χαρακτηριστικά και διαδραματίζει ρόλο κεντρικού ρυθμιστή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση εντός του κυττάρου, αποτελώντας την κύρια πηγή αντιοξειδωτικής θιόλης, και καταλύεται από τα ένζυμα σύνθεσής του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυσσεΐνη (Gsh1) και σύνθεσής της γλουταθειόνης (Gsh1).

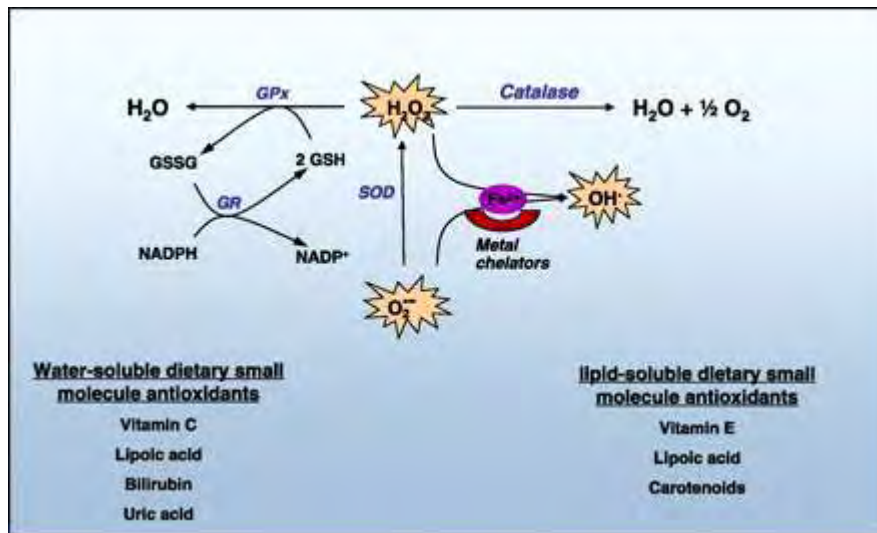
Απαντάται σε δυο μορφές στο κύτταρο, ως ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και ως οξειδωμένη (GSSG) και λαμβάνει μέρος στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εξαιτίας της αναστρέψιμης οξείδωσης που προκαλείται στην ενεργή θειόλη της. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γνωρίζουμε τα επίπεδα τιμών αυτών των δυο μορφών στον οργανισμό, διότι ο λόγος τους (ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) / οξειδωμένη

γλουταθειόνη (GSSG)), αποτελεί δείκτη οξειδωτικής καταπόνησης του οργανισμού. Η σημασία αυτού καταδεικνύεται από το γεγονός, ότι α) η γλουταθειόνη λειτουργεί ως συνένζυμο μεγάλου αριθμού ενζύμων (υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, τρανσεφεράσες γλουταθειόνης και θιόλης κ.α.) που διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο για κύτταρο, β) λαμβάνει μέρος στην κίνηση των αμινοξέων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, γ) προκαλεί την άμεση δέσμευση της ρίζας του υδροξυλίου καθώς και του μονήρες οξυγόνου και ταυτόχρονα απομακρύνει πλήρως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και τα υπεροξείδια των λιπιδίων με τη βοήθεια του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, και τέλος δ) διαθέτει τη δυνατότητα ανάλογα με την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ζεύγους GSH/2GSSG να αναγεννά είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E [Carmel-Harel et al., 2000; Sen, 2000; Moran et al., 2001; Moskaug et al., 2005; Monostori et al., 2009].

Τα **μέταλλα**, σαν το χαλκό, το σελήνιο και το ψευδάργυρο.

Οι **μεταλλοθειονίνες**, πρόκειται για μια ομάδα που αποτελείται από πρωτεΐνες μικρού μεγέθους, πλούσιες σε κυστεΐνη, που προκαλούν την σύνδεση διαφορετικών ιόντων μετάλλων και μπορούν να αντιμετωπίσουν την τοξικότητα που προξενούν ορισμένα μέταλλα (Cu). Ο ρόλος των ιόντων μετάλλων (Cu²⁺, Zn²⁺) στα βιολογικά συστήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την παραγωγή των οξειδωτικών ουσιών, που δείχνει τον άμεσο συσχετισμό των ιόντων μετάλλων και της αντίστασης στην οξειδωτική καταπόνηση.

Τέλος, υπάρχει και μεγάλος αριθμός **αντιοξειδωτικών ουσιών** που προσλαμβάνονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της **διατροφής**, και περιέχονται σε όλα τα φρούτα και τα λαχανικά αλλά δεν ανήκουν στην ομάδα των βιταμινών όπως τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή.



Εικόνα 3: Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού για την απομάκρυνση των ROS/RNS. Τα κύρια ένζυμα απομάκρυνσης των ROS εμφανίζονται με μπλε χρώμα και τα αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους ταξινομούνται με βάση τον υδρόφιλο/λιπόφιλο χαρακτήρα τους [Bashan et al., 2009].

2.4 Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος (cheese – whey protein)

Το γάλα όπως και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που προέρχονται από αυτό πλέον είναι συνυφασμένα και αποτελούν μέρος των λειτουργικών τροφίμων, αφενός μεν διότι αρκετές μελέτες παρουσιάζουν τα πεπτίδια που απομονώνονται από τις πρωτεΐνες γάλακτος να παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες του μεταβολισμού και αφετέρου το διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον από τις βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα πρωτεϊνών γάλακτος και ειδικότερα βιοδραστικών πεπτιδίων μικρού μεγέθους. Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται από τον ορό του γάλακτος (τυρόγαλο), έχουν βρει εφαρμογή σε εμπορική κλίμακα, καθώς η χρήση των απομονωμένων ή συμπυκνωμένων τους μορφών, όπως και των βιοδραστικών τους πεπτιδίων ως συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά σκευάσματα ή ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων, παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο για τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων όσο και για τη μείωση των προβλημάτων ρύπανσης που είχαν συνδεθεί με τη διάθεση του ορού

γάλακτος (τυρόγαλο) [Meisel, 1997; Séverin and Wenshui, 2005; Möller et al., 2008; Nagpal et al., 2011].

Τα τελευταία χρόνια ο ορός του γάλακτος (τυρόγαλο) είχε χαρακτηριστεί λανθασμένα ως ρυπογόνος εξαιτίας του υψηλού του περιεχομένου σε λακτόζη και πρωτεΐνες, παρόλα αυτά πλέον αποτελεί ένα δημοφιλές συμπλήρωμα διατροφής διαφόρων λειτουργικών τροφίμων και παρόμοιων προϊόντων, δεδομένου ότι οι ενώσεις που το αποτελούν εμφανίζουν λειτουργικά, φυσιολογικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να συμμετέχει σε ένα πλήθος δυνητικών εφαρμογών [Galvão et al., 2001].

➤ Πλεονεκτήματα από τη χρήση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος
1. Υψηλή διατροφική αξία του πρωτεϊνικού περιεχομένου λόγω των υπολειμμάτων των αμινοξέων (π.χ. Lys, Thr, Leu, Ser).
2. Παράλληλη παραγωγή λακτόζης.
3. Μείωση της ρύπανσης εξαιτίας του βιοχημικώς απαιτούμενου οξυγόνου των πρωτεϊνών.

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα από τη χρήση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος.

➤ Μειονεκτήματα από τη χρήση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος
➤ Υψηλή αραίωση και κατά συνέπεια υψηλό κόστος αφυδάτωσης.
➤ Υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, περίπου το 10 % επί της ξηρής ουσίας και σε ζάχαρη.
➤ Διάσπαρτες μονάδες παραγωγής τυριών και ιδιαίτερα ευπαθής πρώτη ύλη.
➤ Εξειδικευμένος τεχνικός εξοπλισμός για τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης τυρογάλακτος.

Πίνακας 2: Μειονεκτήματα από τη χρήση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος.

2.5 Ο «άνθρακας» της βιομηχανίας παρασκευής τυριού που μετατράπηκε σε «χρυσό», ενσωματώθηκε και αξιοποιήθηκε στη διατροφή και στην επεξεργασία τροφίμων

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος περιλαμβάνει σημαντικά φυσικοχημικά, βιολογικά, λειτουργικά και τεχνολογικά πλεονεκτήματα που της δίνουν τη δυνατότητα να αποτελεί μέρος των τροφίμων σε βιομηχανική κλίμακα, παρέχοντας ενέργεια και απαραίτητα αμινοξέα σε συνδυασμό με τη καταλυτική βοήθεια που προσφέρει στην ανάπτυξη και στην αποκατάσταση των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η σημασία των λειτουργικών της πλεονεκτημάτων επεκτείνεται τόσο στην υφή και τη δομή αλλά και στη συνολική εμφάνιση των τροφίμων (στο σχηματισμό τζελ, στη σταθερότητα του αφρού και στην κατακράτηση του νερού).

Ανάλογα με τον τρόπο ανάκτησης, μπορεί να προκύψουν δυο μορφές της πρωτεΐνης τυρογάλακτος όπου ο ένας περιλαμβάνει την όξινη πρωτεΐνη τυρογάλακτος, που προκύπτει με τον διαχωρισμό από την καζεΐνη με τη βοήθεια καθίζησης του οξέος στο ισοηλεκτρικό του σημείο (με pH 4.6 σε θερμοκρασία δωματίου) και ο άλλος περιλαμβάνει τη γλυκιά πρωτεΐνη τυρογάλακτος που αποτελεί την πιο συχνή διαδικασία

πήξης με τη βοήθεια ενζύμων. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι ο ορός του γάλακτος περιέχει περίπου 93 % νερό, ταυτόχρονα περιέχει στοιχεία σημαντικής αξίας, περίπου το ½ των θρεπτικών στοιχείων που ανιχνεύονται στο πλήρες γάλα και πιο συγκεκριμένα το θρεπτικό στοιχείο που βρίσκεται σε υψηλότερο ποσοστό είναι η λακτόζη (4.5-5 %, w/v), έπειτα βρίσκονται οι διαλυτές πρωτεΐνες (0.6-0.8 % w/v), τα λιπίδια (0.4-0.5 % w/v), τα ιχνοστοιχεία κυρίως το ασβέστιο και τέλος βιταμίνες όπως η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη και η πυριδοξίνη. Όλα τα παραπάνω δείχνουν πως ο «άνθρακας» της βιομηχανίας παρασκευής τυριού μετατράπηκε σε «χρυσό», που μπορεί να ενσωματωθεί και να αξιοποιηθεί στις βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων μειώνοντας έτσι το δυσβάσταχτο κόστος για την αντιμετώπιση ή/και τον έλεγχο χρόνιων ασθενειών που μαστιίζουν τις σύγχρονες κοινωνίες [de Wit, 1998; Galligan, 1999; Huffman and Harper, 1999; Vegarud et al., 2000; FitzGerald et al., 2004; Ward and German 2004; Henning et al., 2006].

Σχετικά με τους μηχανισμούς που βρίσκονται πίσω από τη δράση των βιοδραστικών αυτών πεπτιδίων, κάποιοι μπορεί υπόκεινται στη ρύθμιση συγκεκριμένων υποδοχέων, άλλοι μπορεί να υπόκεινται στην αναστολή μέσω συγκεκριμένων ενζύμων, ενώ άλλοι μπορεί να ρυθμίζουν την εντερική απορρόφηση και να εμφανίζουν αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά. Σε κάθε περίπτωση ο οξειδωτικός μεταβολισμός είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου, όμως υπάρχει το ενδεχόμενο να υπάρξει υπερβολική παραγωγή ROS, που να οδηγήσει σε καταστάσεις οξειδωτικής καταπόνησης. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως η πρωτεΐνη ορού γάλακτος διαθέτει αντιοξειδωτική δράση, πιθανόν λόγω των κατάλοιπων αμινοξέων της Tyr και της Cys, ένας μηχανισμός που πιθανόν βασίζεται στη σύζευξη πρωτονίων – ηλεκτρονίων ή στους μηχανισμούς μεταφοράς των ατόμων του υδρογόνου ή στην αποσιδήρωση των μετάλλων μετάπτωσης [Rutherford-Markwick and Moughan, 2005; Hartmann and Meisel, 2007; Walther and Sieber, 2011; Udenigwe and Aluko, 2012].

3. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης τυρογάλακτος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορίσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες για να εξετάσουμε εάν η πρωτεΐνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και αν ναι, σε ποια τιμή συγκεντρώσεως της.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4Α. ΥΛΙΚΑ

4.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Gibco, Sigma-Aldrich και Becton-Dickinson.

4.1.2 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με 10 % FBS, ενώ στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS.

Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με 10 % FBS	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς FBS
250 ml DMEM 41966	250 ml DMEM 41966
25 ml FBS	2,5 ml pen/str
2,5 ml pen/str	2,5 ml γλουταμίνη
2,5 ml γλουταμίνη	-

Πίνακας 3 : Η σύσταση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας των κυττάρων EAhy 926.

Υπόλοιπα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας
1. Θρυψίνη 0.25 % - Gibco
2. PBS pH 7.4 - Phosphate buffer saline 1x - Gibco
3. Χρωστική Orange Mercury - Sigma
4. Χρωστική DCF - Sigma
5. FACS Clean -Becton - Dickinson
6. FACS Sheath -Becton - Dickinson
7. FACS Rinse - Becton - Dickinson
8. Cell proliferation kit II (XTT) - Sigma

Πίνακας 4 : Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

4.1.3 Κυτταρική σειρά EA.hy 926

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τύπου EA.hy 926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549). Η αθανοτοποιημένη κυτταρική σειρά που προέκυψε διαθέτει πολλές αγγειακές, ενδοθηλιακές ιδιότητες και επίσης η κυτταρική αυτή σειρά μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Ακόμη, διαθέτει

ένα μοναδικό δείκτη χρωμοσωμάτων που βοηθά στην εύκολη ταυτοποίηση τους. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν αυτή την κυτταρική σειρά ως πρότυπο για τη μελέτη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου [Edgell et al., 1983].



Εικόνα 4: Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926.

4B. Μέθοδοι

4.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926

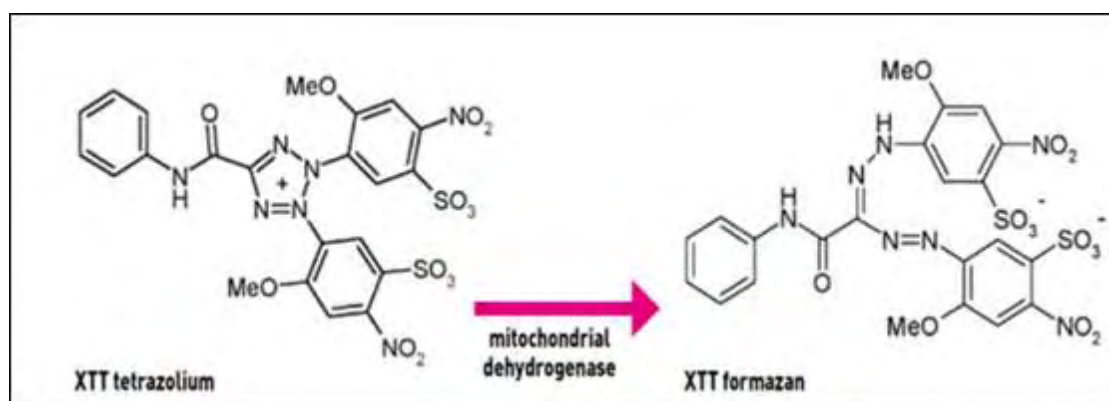
Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα, ώστε να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα

με 500 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

4.2.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο XTT

4.2.2α Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της πρωτεΐνης του τυρογάλακτος στους μυοβλάστες χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 5: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

4.2.2β Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γινόταν επίστρωση 10000 κυττάρων/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του τριβλίου της καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούσαν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης τυρογάλακτος ή του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, επωάζονταν για 24 ώρες. Τα κύτταρα στα οποία προσθέσαμε τον οξειδωτικό παράγοντα επώαστηκαν για 1 ώρα. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της πρωτεΐνης έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση

εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της πρωτεΐνης στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων EA.hy 926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

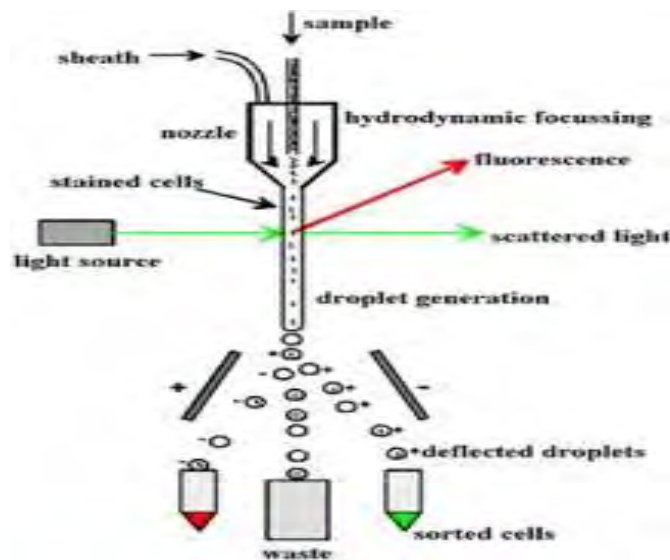


Εικόνα 6: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer, β) 96-well plate.

4.2.3 Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου

στην οποία βρίσκονται. Η δέση φωτός (συνήθως δέση λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέση του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέση φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 7: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε

ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

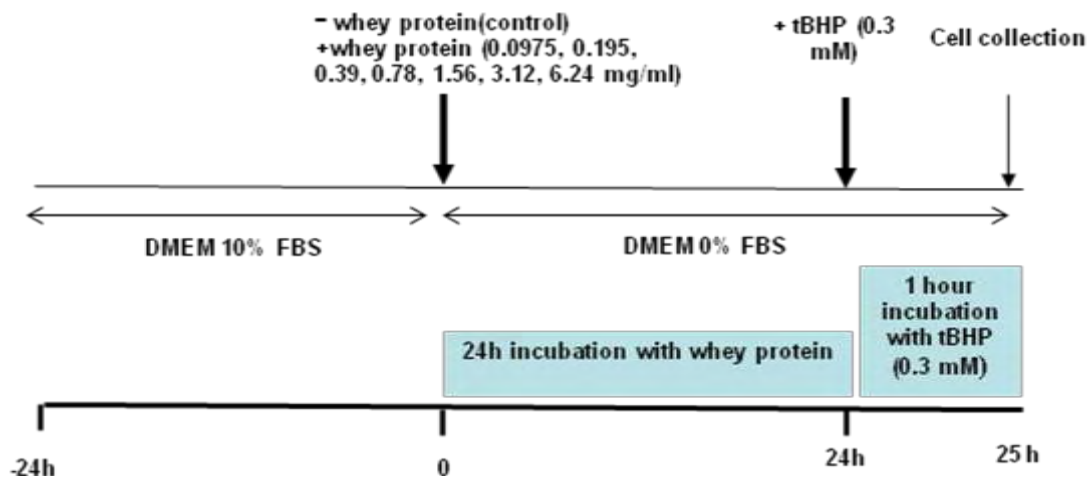


Εικόνα 8: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.

4.2.4 Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Τα κύτταρα επωάζονται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (5 mL), ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και η πρωτεΐνη (500 μ L) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης για 24 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού FBS (4,5 ml) με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP (500 μ L) για 1h. Χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με την πρωτεΐνη και τον t-BHP και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Ακολούθησε ο προσδιορισμός των ελευθέρων ριζών και της γλουταθειόνης με κυτταρομετρία ροής και των επιπέδων TBARS φασματοφωτομετρικά αφού προηγήθηκε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.



Εικόνα 9: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη γλουταθειόνη, τις ελεύθερες ρίζες και τα TBARS στα κύτταρα EA.hy 926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της πρωτεΐνης και του t-BHP. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

4.2.5 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)

4.2.5α Πειραματική διαδικασία

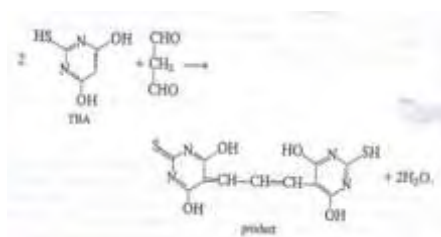
Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 μ L PBS και 15 μ L χρωστικής mercury orange ή 15 μ L χρωστικής DCF για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5% CO₂. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250 μ L PBS και

φυγοκεντρώμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 μL PBS και προχωράμε στην ανάλυση.

4.2.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

4.2.6α Αρχή μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Η μηλονική διαλδεΰδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία $\frac{1}{2}$ αντίστοιχα.



Εικόνα 10: Αντίδραση του TBA με την MDA.

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΰδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

4.2.6β Πειραματική διαδικασία

400 μL κυτταρικού αιωρήματος (80-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πρωτεΐνη) για τα δείγματα ή 400 μl απεσταγμένο νερό για το τυφλό προστέθηκαν σε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCL (200mM, pH 7.4) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml Na_2SO_4 (2M)-TBA (55mM) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και έπειτα αφού προστέθηκε 1 mL TCA 70% τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το 'τυφλό' και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >30 μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

4.2.6.γ. Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_s - A_0) / 0,156] \times 7,5 / C_s$$

A_s : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

$\epsilon_{530\text{MDA}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μηλονικής διαλδεΰδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντιδρασης}} / \mu\text{L}$ αιωρήματος [3000 μL / 400 μL]).

C_8 : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

4.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm [Bradford, 1976].

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η

πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

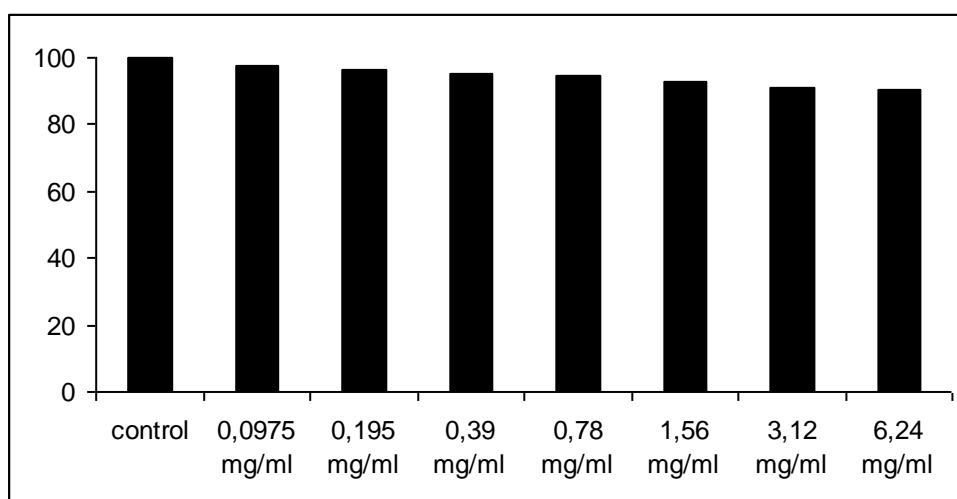
4.2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης του τεστ του Tukey. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

5. Αποτελέσματα

5.1 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά EA.hy926 στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

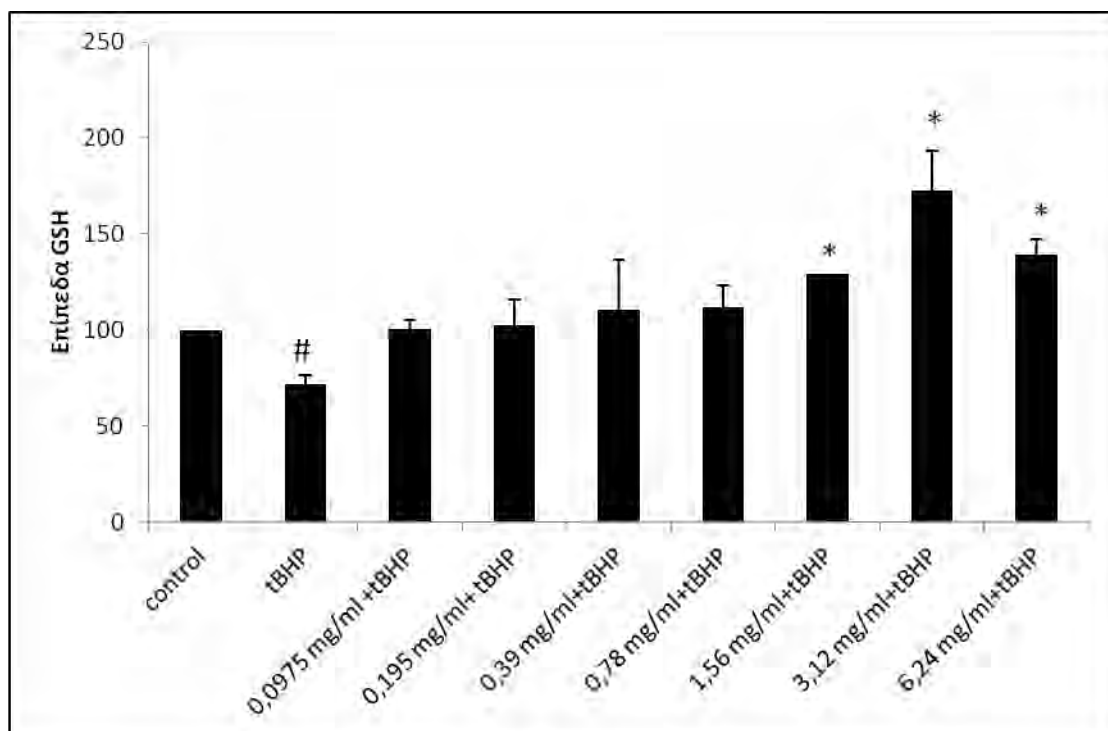


Γράφημα 1: Η % βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 υπό την επίδραση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος.

5.2 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής

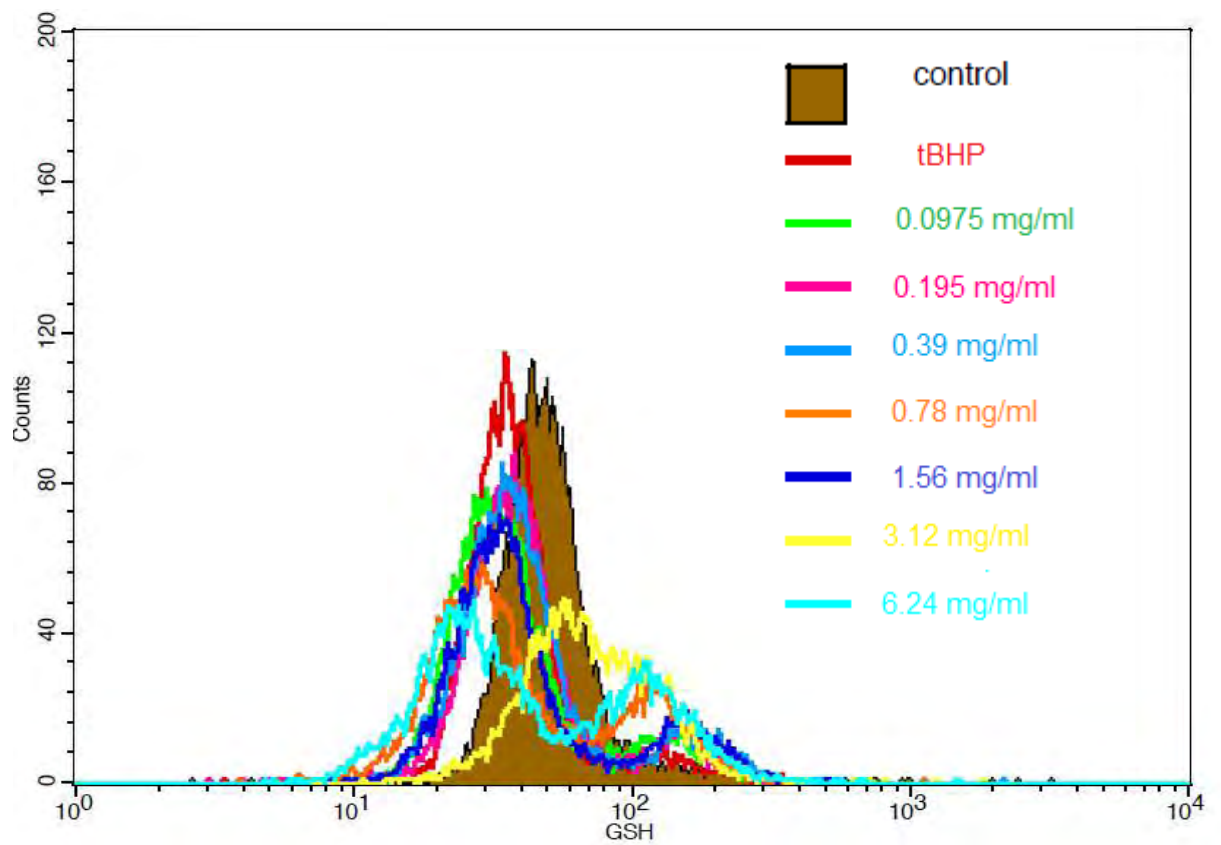
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3mM) για 1 ώρα. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 2 τα επίπεδα της γλουταθειόνης μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα μειώθηκαν σημαντικά κατά 28.6 % σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 40.5%, 43.7%, 54.3%, 56.19%, 82.6%, 141% και 95.5% σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.

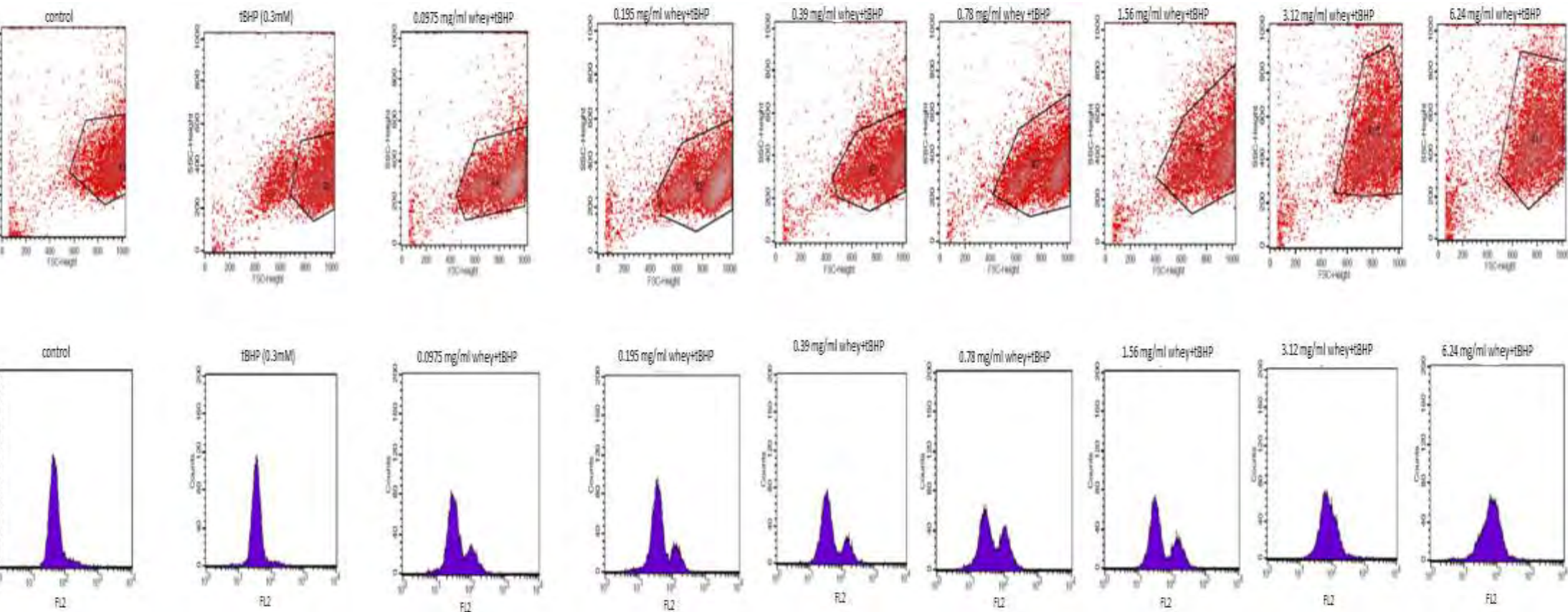


Γράφημα 2: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 h. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($P < 0.05$). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BHP ($P < 0.05$).

Στο γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης τυρογάλακτος, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.



Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.



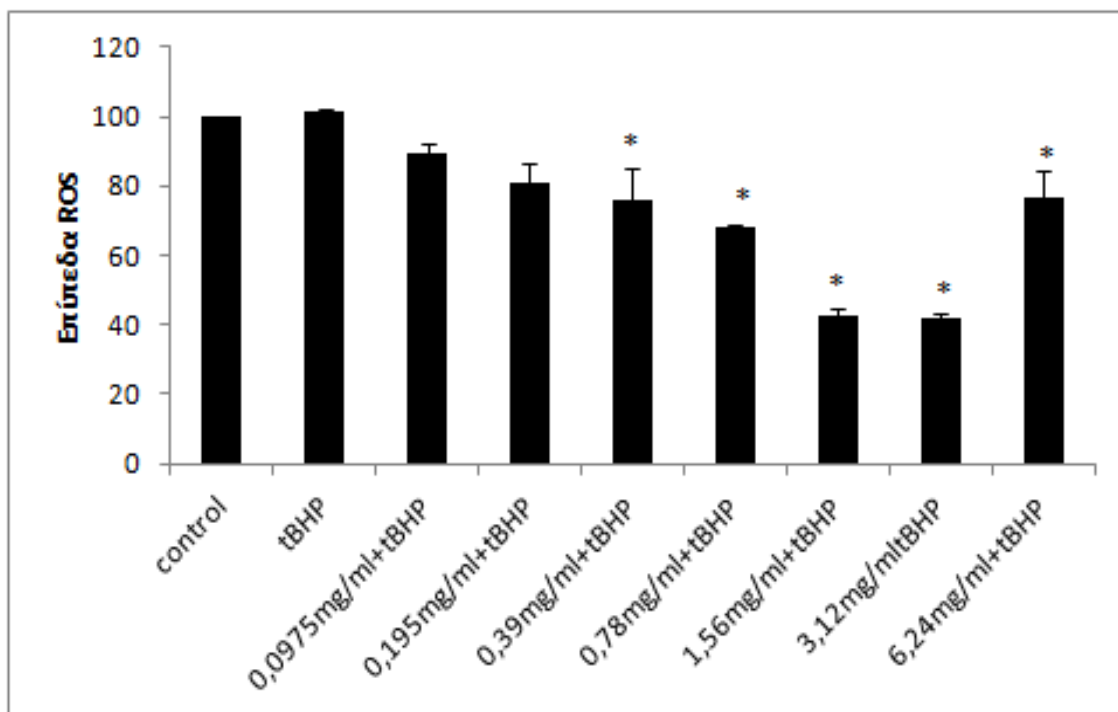
Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BHP.

5.3 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

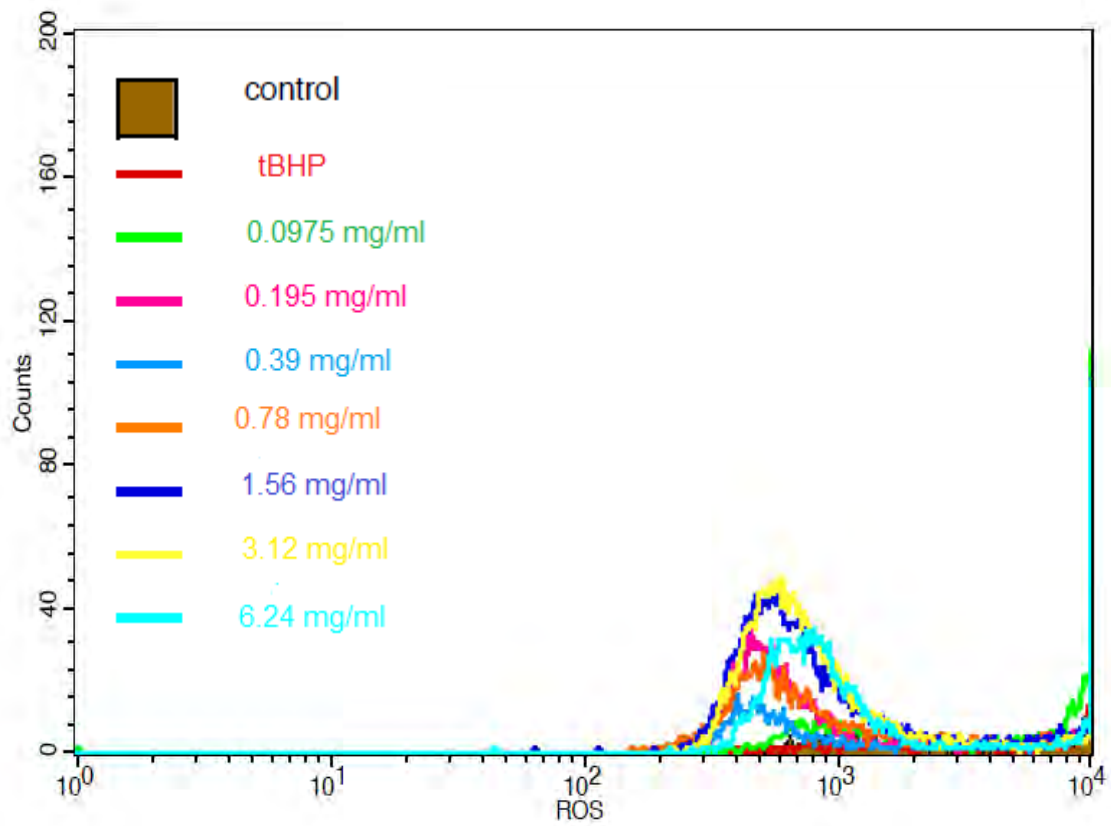
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3mM) για 1 ώρα. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5 τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ROS κατά 11.58%, 20.18%, 24.6%, 32.6%, 57.83%, 58.54% και 24.37% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.

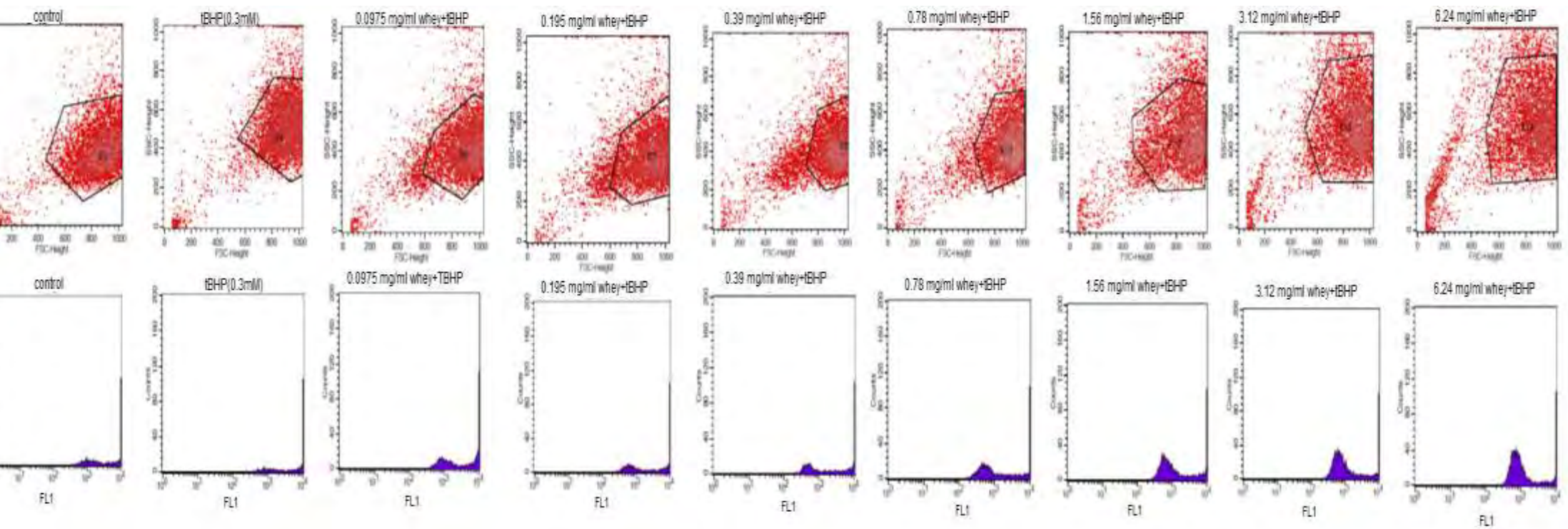
Στο γράφημα 5 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα αριστερά. Αυτό υποδηλώνει μειωμένα επίπεδα ROS.



Γράφημα 5: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BHP (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BHP (0,3 mM) για 1 ώρα. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BHP (P<0.05).



Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

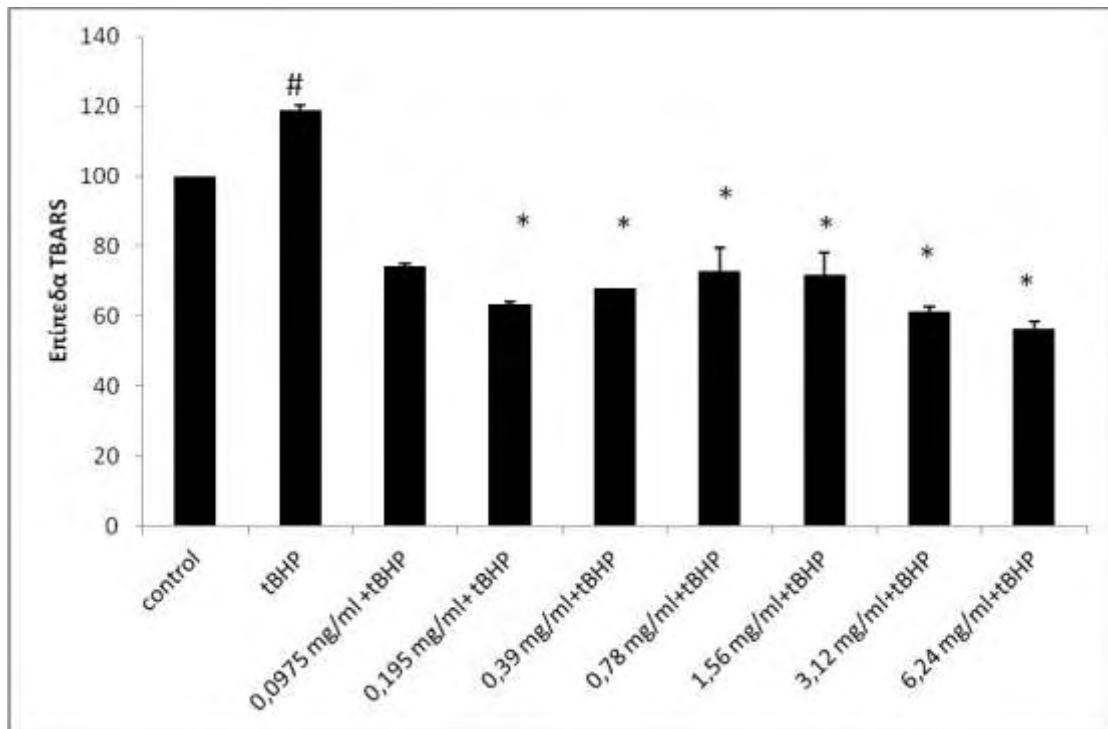


Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BHP και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BHP.

5.4 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

Ο προσδιορισμός των TBARS έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy.926 επώαστηκαν με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0,3mM) για 1 h. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα των TBARS υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BHP) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 8 τα επίπεδα των TBARS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα αυξήθηκαν κατά 19% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα TBARS κατά 37%, 47%, 43%, 39%, 40%, 48% και 53% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα.



Γράφημα 8: Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BPH (0,3μM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) για 24 ώρες + t-BPH (0,3 mM) για 1 ώρα. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control (P<0.05).* Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BPH (P<0.05).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό πως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί πλην των αναερόβιων μικροοργανισμών, χρειάζονται το μοριακό οξυγόνο που θα παίξει ρόλο δέκτη ηλεκτρονίων για να παράξουν αποτελεσματικά ενέργεια έτσι ώστε να επιτελέσουν όλες τις λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση τους. Ταυτόχρονα όμως, το μοριακό οξυγόνο, όντας ένα ισχυρό οξειδωτικό μπορεί να συμμετάσχει και σε δευτερογενείς οξειδώσεις που να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία του φυσιολογικού μεταβολισμού ή να αποβούν μοιραίες για το κύτταρο, σε περίπτωση που το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού δράσει αναποτελεσματικά. Αυτή η κατάσταση περιγράφεται με τον όρο «οξειδωτικό στρες» και αναφέρεται στην κατάσταση που παρατηρείται αερόβια όταν οι δευτερογενείς οξειδώσεις που προκαλούνται από το μοριακό οξυγόνο και τα παράγωγα του, δεν αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά από το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού και παρατηρούνται δυσλειτουργίες ή/και ανωμαλίες στο μεταβολισμό, απώλεια φυσιολογικών λειτουργιών, ασθένεια ακόμη και θάνατος του κυττάρου. Παράλληλα, ο οργανισμός λαμβάνει πολλές ουσίες που μπορούν να λειτουργούν από μόνες τους ως οξειδωτικά ή ως πρόδρομα οξειδωτικά είτε μέσω των τροφών είτε από το περιβάλλον όπως είναι οι ρύποι του αέρα, το κάπνισμα, η ακτινοβολία UV. Αν και, ο οργανισμός διαθέτει συστήματα επιδιόρθωσης διαφόρων κατεστραμμένων μορίων/ιστών και συστήματα προσαρμογής σε καταστάσεις που διαταράσσουν την ομοιόσταση του, ωστόσο υπάρχει το ενδεχόμενο το ποσοστό των οξειδωτικών ουσιών να είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό των αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα να μπορούν να αντιδράσουν με μια σειρά βιομορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA), προκαλώντας δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση με τις πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση τους και να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας τους ή την πρόωρη αποδόμηση των πρωτεοσωμάτων. Η αντίδραση με τα λιπίδια μπορεί να οδηγήσει στην υπεροξείδωση τους που λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στη μεμβράνη

του πλάσματος και να έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των φυσικών τους ιδιοτήτων και κατ' επέκταση των βιολογικών τους λειτουργιών. Τέλος, η αντίδραση με το DNA μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση του και να έχει ως αποτέλεσμα τις μεταλλάξεις γονιδίων κατ' επέκταση αλλαγές στη πρωτεϊνοσύνθεση, μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων, απόπτωση και πιθανόν τον κυτταρικό θάνατο [Brömme et al., 2005; Battin and Brumaghim, 2009; Liu, 2010; Weiderpass, 2010; Yanar et al., 2011]. Έτσι, κατά τη διάρκεια παρατεταμένων περιόδων οξειδωτικού στρες παρατηρείται συσσώρευση ROS στον οργανισμό, γεγονός που ενοχοποιείται για πλήθος χρόνιων παθήσεων είτε ως αιτία είτε ως συνέπεια αυτού του γεγονότος όπως η αθηροσκλήρωση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές (αλτσχάϊμερ, πάρκινσον), ο καρκίνος κ.α [Beer et al., 2002; Eleuteri et al., 2009].

Ο περιορισμός αυτού του φαινομένου μπορεί να επιτευχθεί ενδοκυτταρικά όταν ο οργανισμός διαθέτει ένα υψηλό ποσοστό του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH), ποσοστό καθοριστικό για την άμυνα του κυττάρου ενάντια στο οξειδωτικό στρες, διότι το μειωμένο ποσοστό της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (GSH) επιτρέπει τη συσσώρευση των ROS [Circu and Aw, 2008; Lin et al., 2010]. Ουσιαστικά, η γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή μπορεί να προσφέρει ένα πρωτόνιο του σουλφυδικού δεσμού της και με αυτό τον τρόπο να αναχαιτίσει τη δράση των ROS. Πιο συγκεκριμένα, όταν λάβει χώρα η οξείδωση της, δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ δυο μορίων οξειδωμένης γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), όπου το υψηλό ενδοκυτταρικό ποσοστό GSH/ GSSG εξασφαλίζει τη βέλτιστη προστασία των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες. Για να εξασφαλίζεται ενδοκυτταρικά αυτό το υψηλό ποσοστό, λαμβάνουν χώρα δυο κυτταρικοί μηχανισμοί. Ο ένας λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης όπου μειώνεται το ποσοστό του της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) προς της ενεργή μορφή της γλουταθειόνης (ανηγμένη γλουταθειόνη) και ο δεύτερος λαμβάνει χώρα

με τη βοήθεια της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και της συνθετάσης της γλουταθειόνης. Για να πραγματοποιηθεί ενδοκυτταρικά η σύνθεση της γλουταθειόνης απαραίτητη προϋπόθεση είναι να επαρκούν οι ποσότητες των αμινοξέων του γλουταμικού οξέος, της κυστεΐνης και της γλυκίνης. Ωστόσο, περιοριστικό ρόλο στη συγκεκριμένη κυτταρική σύνθεση διαδραματίζει η διαθεσιμότητα του αμινοξέος της κυστεΐνης [Giordano et al., 2011; Zhang and Forman, 2012]. Ακόμη, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο που προκύπτει από το σελήνιο και την κυστεΐνη, διαθέτει την ικανότητα να προλαμβάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, διότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και να το μετατρέψει σε νερό, μειώνοντας έτσι την ισχυρή οξειδωτική του δράση.

Αξίζει να σημειωθεί πως δίαιτες που το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο είναι πλούσιο σε κυστίνη, όπου η κυστίνη αποτελεί το δισουλφίδιο της κυστεΐνης φαίνεται να αυξάνουν την ενδοκυτταρική γλουταθειόνη. Παράδειγμα πρωτεΐνης πλούσια σε κυστίνη αποτελεί η πρωτεΐνη τυρογάλακτος που από τις βιομηχανίες παρασκευής τυριού λανθασμένα αντιμετωπιζόταν ως ρύπος, όπου μελέτες σε ανθρώπους και ποντικούς έχουν δείξει πως η κατανάλωση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο πλάσμα και περιορίσε τις επιπτώσεις των όγκων σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου [Smithers et al., 1996; Parodi, 2007; Kanwar et al., 2009; Attaallah et al., 2012; Fujita et al., 2012; Singh et al., 2012].

Έτσι, οι βιολογικές λειτουργίες που χαρακτηρίζουν τα πεπτίδια αλλά και ολόκληρη την πρωτεΐνη τυρογάλακτος δημιούργησαν πρόσφορο έδαφος για να αυξηθεί το ενδιαφέρον ώστε να χρησιμοποιηθεί η ίδια η πρωτεΐνη ή τα προϊόντα της ως συστατικά λειτουργικών τροφίμων και φαρμακευτικών εφαρμογών αλλά και ως θρεπτικά συστατικά διατροφικών συμπληρωμάτων και τροφίμων που σχετίζονται με την υγεία. Πιο συγκεκριμένα, τα πεπτίδια που αποτελούν την πρωτεΐνη τυρογάλακτος περιλαμβάνουν τη λακτοφερίνη, τη β-λακτοσφαιρίνη, την

άλφα-λακταλβουμίνη, τα γλυκομακροπεπτίδια και τις ανοσοσφαιρίνες που της προσδίδουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων για την αποτελεσματική προστασία του οργανισμού όπως αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές, υπολιπιδαιμικές, αντιαρτηρικές, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντιθρομβωτικές και προστατευτικές ιδιότητες ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου [Kanwar et al., 2009; Ricci et al., 2010; Nagpal et al., 2011; Sinha et al., 2013].

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στις διάφορες συγκεντρώσεις της που έλαβαν χώρα κατά την πειραματική διαδικασία σε επιθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy 926), όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της μεθόδου XTT διαπιστώθηκε πως στις διάφορες συγκεντρώσεις (0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml) που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων η πρωτεΐνη τυρογάλακτος δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να προστατεύονται από την βλαβερή επίδραση του οξειδωτικού στρες. Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), όπου τα κύτταρα μετά από επώαση με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP παρουσίασαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 28.6 % συγκριτικά με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 40.5 %, 43.7 %, 54.3 %, 56.19 %, 82.6 %, 141 % και 95.5 % σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα. Επομένως, τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκαν σημαντικά έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Xu et al., 2011 βρέθηκε ότι στην κυτταρική σειρά C2C12 (μυοβλάστες ποντικού) υπό την επίδραση διαφορετικού οξειδωτικού παράγοντα

(H₂O₂), η επώαση με 0,5mg/ml πρωτεΐνης τυρογάλακτος (80,5% περιεκτικότητα) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης κατά 70%. Σε μια άλλη έρευνα από τους Yang-Ming Tseng et al., 2006, βρέθηκε ότι η επώαση με πρωτεΐνη ορού του γάλακτος (90% περιεκτικότητα) αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά PC12 (προέρχονται από μυελό επινεφριδίων ποντικού) έπειτα από επαγωγή οξειδωτικού στρες από αιθανόλη κατά 22% για συγκέντρωση πρωτεΐνης 1mg/ml και κατά 73,8% για συγκέντρωση 10mg/ml. Ακόμα, μια έρευνα των Kent et al., 2003 έδειξε ότι η υδρολυμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος (90,5% περιεκτικότητα) συγκέντρωσης 0,5mg/ml προκάλεσε αύξηση της γλουταθειόνης κατά 64% σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προστάτη.

Ως πιθανή αιτία της παρατηρούμενης αύξησης στα επίπεδα GSH αναφέρεται η αυξημένη παροχή υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα με αποτέλεσμα να επάγεται η ενδογενής παραγωγή γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος στα επίπεδα γλουταθειόνης φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα αυτών (κυρίως της αλβουμίνης, της λακτοφερρίνης και της α-λακταλβουμίνης) σε κυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα της γλουταθειόνης, ωστόσο είναι και το αμινοξύ που καθορίζει το ρυθμό βιοσύνθεσης της [Sen,1997; Anderson, 1998; Griffith, 1999; Lu, 1999], καθώς υπάρχει ανταγωνισμός για τη χρήση της κυστεΐνης είτε για την παραγωγή GSH είτε για την πρωτεΐνοσύνθεση, με τη δεύτερη να ευνοείται όταν τα επίπεδα του αμινοξέος στο κύτταρο είναι χαμηλά. Επομένως, αν ληφθεί μέσω της τροφής μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη όπως οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, τότε θα επαχθεί η βιοσύνθεση γλουταθειόνης. Εκτός όμως από την προσφορά κυστεΐνης, οι πρωτεΐνες ορού του γάλακτος φαίνεται να επάγουν την σύνθεση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της σε ανηγμένη, αναγεννώντας την [Kent et al., 2003; Yang-Ming Tseng et al., 2006; Xu et al., 2011].

Ακόμη, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ROS, όπου τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του

οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν συγκριτικά με το control γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που παράγει το t-BHP από ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου όπως η γλουταθειόνη. Ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ROS κατά 11.58 %, 20.18 %, 24.6 %, 32.6 %, 57.83 %, 58.54 % και 24.37 % συγκριτικά με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα. Επομένως, η επώαση με την πρωτεΐνη τυρογάλακτος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των ROS.

Τα επίπεδα των TBARS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα αυξήθηκαν κατά 19% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα TBARS κατά 37%, 47%, 43%, 39%, 40%, 48% και 53% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg/ml αντίστοιχα. Μείωση στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Xu et al, 2011 όπου η πρωτεΐνη τυρογάλακτος μείωσε την MDA κατά 22,7%. Επίσης, σε μια in vivo μελέτη σε ανθρώπους που έγινε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών η χορήγηση ενός πειραματικού κέικ που περιείχε υδατάνθρακες και πρωτεΐνη τυρογάλακτος (αναλογία 3,5:1), μείωσε τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) [Kerasioti et al., 2012].

Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των κυττάρων πιθανώς λόγω και του πλούσιου περιεχομένου της σε κυστεΐνη που αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης και κατ' επέκταση μειώνει τα ROS. Αυτή η δράση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος δημιουργεί πρόσφορο έδαφος να χρησιμοποιηθεί η ίδια η πρωτεΐνη ή τα προϊόντα της σε βιολειτουργικά τρόφιμα ή σε διατροφικά συμπληρώματα. Για παράδειγμα, στα πλαίσια μελέτης που γίνεται στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έχει δημιουργηθεί κέικ που περιέχει υδατάνθρακες και πρωτεΐνη τυρογάλακτος (αναλογία 3,5:1), η χορήγηση του οποίου σε ανθρώπους

έδειξε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αντιοξειδωτική δράση [Kerasioti et al., 2012] καθώς και αντιφλεγμονώδη η οποία εν μέρει μπορεί να οφείλεται στην αντιοξειδωτική [Kerasioti et al., 2013]. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην άσκηση της αντιοξειδωτικής της δράσης, είναι ένα φαινόμενο που πρέπει να αναλυθεί διεξοδικότερα στο μέλλον.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Albano E (2006):** Alcohol, oxidative stress and free radical damage., Proc Nutr Soc., 65, 278-290.
- **Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T (2004):** Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise., Free Radic Biol Med., 37, 480-487.
- **Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV (2011):** Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms., Br J Dermatol., 165, 1162-1168.
- **Attaallah W, Yilmaz AM, Erdoğan N, Yalçın AS, Aktan AO (2012):** Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats., Pathol Oncol Res., 18, 817-822.
- **Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009):** Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species., Physiol Rev., 89, 27-71.
- **Battin EE, Brumaghim JL (2009):** Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms., Cell Biochem Biophys., 55, 1-23.
- **Beer TM, Evans AJ, Hough KM, Lowe BA, McWilliams JE, Henner WD (2002):** Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk., Prostate Cancer Prostatic Dis., 5, 22-27.
- **Benov L, Beema AF (2003):** Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis, Free Radic Biol Med., 34, 429-433.
- **Berlett BS, Stadtman ER (1997):** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress., J Biol Chem., 272, 20313-20316.

- **Bradford MM (1976):** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding., *Anal Biochem.*, 72, 248-254.
- **Briganti S, Picardo M (2003):** Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new., *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 17, 663-669.
- **Brömme HJ, Weinandy R, Peschke E (2005):** Influence of oxygen concentration on redox cycling of alloxan and dialuric acid., *Horm Metab Res.*, 37, 729-733.
- **Carmel-Harel O, Storz G (2000):** Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress., *Annu Rev Microbiol.*, 54, 439- 461.
- **Channon KM and Guzik TJ (2002):** Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors, *J Physiol Pharmacol.*, 53, 515-524.
- **Cheng FC, Jen JF, Tsai TH (2002):** Hydroxyl radical in living systems and its separation methods., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 781, 481-496.
- **Circu ML, Aw TY (2008):** Glutathione and apoptosis., *Free Radic Res.*, 42, 689-706.
- **Cook JA, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB (2004):** Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment, *Semin Radiat Oncol.*, 14, 259-266.
- **Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT (2002):** Exercise, free radicals and oxidative stress., *Biochem Soc Trans.*, 30, 280-285.
- **Dallner G, Brismar K, Chojnacki T, Swiezewska E (2003):** Regulation of coenzyme Q biosynthesis and breakdown., *Biofactors.*, 18, 11-22.

- **de Wit JN (1998):** Marschall Rhône-Poulenc Award Lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci.*, 81, 597-608.
- **Dizdaroglu M (2005):** Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases., *Mutat Res.*, 591, 45-59.
- **Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002):** Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radic Biol Med.*, 32, 1102-1115.
- **Dröge W (2002):** Free radicals in the physiological control of cell function., *Physiol Rev.*, 82, 47-95.
- **Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983):** Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 80, 3734-3737.
- **Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, Carbone M, Colombo M, La Rocca G, Anzalone R, Tarro Genta F, Zummo G, Di Stefano A, Giannuzzi P (2009):** Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure., *Front Biosci.*, 14, 2230-2237.
- **Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C (2007):** Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis, *J Cancer.*, 121, 2381-2386.
- **FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ (2004):** Hypotensive peptides from milk proteins., *J Nutr.*, 134, 980-988.
- **Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M, Tsuda H (2004):** Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rat., *Cancer Lett.*, 213, 21-29.
- **Galligan DT (1999):** The economics of optimal health and productivity in the commercial dairy., *Rev Sci Tech.*, 18, 512-519.
- **Galvão CM, Silva AF, Custódio MF, Monti R, Giordano RL (2001):** Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and alpha-chymotrypsin., *Appl Biochem Biotechnol.*, 91-93, 761-776.

- **Geanacopoulos M (2004):** The determinants of lifespan in the nematode *Caenorhabditis elegans*: a short primer., *Sci Prog.*, 87, 227-247.
- **Giordano G, White CC, Costa LG (2011):** Assessment of glutathione homeostasis., *Methods Mol Biol.*, 758, 205-214.
- **Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K (2001):** Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 56, 459-467.
- **Gutteridge JM, Halliwell B (1989):** Iron toxicity and oxygen radicals., *Baillieres Clin Haematol.*, 2, 195-256.
- **Halliwell B (2001):** Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging*, 18, 685-716.
- **Halliwell B, Chirico S. (1993):** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *Am J Clin Nutr.*, 57, 715-725.
- **Hartmann R, Meisel H (2007):** Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications., *Curr Opin Biotechnol.*, 18, 163-169.
- **Henning DR, Baer RJ, Hassan AN, Dave R (2006):** Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads., *J Dairy Sci.*, 89, 1179-1188.
- **Horton JW (2003):** Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy., *Toxicology.*, 89, 75-88.
- **Huffman LM, Harper WJ (1999):** Maximizing the value of milk through separation technologies., *J Dairy Sci.*, 82, 2238-2244.
- **Israël N and Gougerot-Pocidalò MA (1997):** Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection, *Cell Mol Life Sci.*, 53, 864-870.

- **Jung KA, Kwak MK (2010):** The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants., *Molecules.*, 15, 7266-7291.
- **Kanter M (1998):** Free radicals, exercise and antioxidant supplementation., *Proc Nutr Soc.*, 57, 9-13.
- **Kanwar JR, Kanwar RK, Sun X, Punj V, Matta H, Morley SM, Parratt A, Puri M, Sehgal R (2009):** Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation to human health., *Curr Protein Pept Sci.*, 10, 308-338.
- **Kanwar JR, Kanwar RK, Sun X, Punj V, Matta H, Morley SM, Parratt A, Puri M, Sehgal R (2009):** Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation to human health., *Curr Protein Pept Sci.*, 10, 308-338.
- **Kerasioti E, Stagos D, Jamurtas A, Kiskini A, Koutedakis Y, Goutzourelas N, Pournaras S, Tsatsakis AM, Kouretas D (2013):** Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-whey protein cake after exhaustive cycling in humans., *Food Chem Toxicol.*, 13, 61-66.
- **Kerasioti E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis AM, Koutedakis Y, Stagos D, Kouretas D, Karathanos V (2012):** Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans., *Food Chem Toxicol.*, 50, 2805-2810.
- **Kent KD, Harper WJ, Bomser JA (2003):** Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells., *Toxicol In Vitro*, 17, 27-33.
- **Knight JA (2000):** The biochemistry of aging., *Adv Clin Chem.*, 35, 1-62.
- **Kobayashi M, Yamamoto M (2005):** Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation., *Antioxid Redox Signal.*, 7, 385-394.

- **Lännergren J, Westerblad H, Bruton JD (1996):** Slow recovery of force in single skeletal muscle fibres., *Acta Physiol Scand.*, 156, 193-202.
- **Lee SJ, Yang ES, Kim SY, Kim SY, Shin SW, Park JW (2008):** Regulation of heat shock-induced apoptosis by sensitive to apoptosis gene protein., *Free Radic Biol Med.*, 45, 167-176.
- **Lenaz G, Bovina C, Formigini G, Parenti Castelli G (1999):** Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences., *Acta Biochim Pol.*, 46, 1-21.
- **Lin X, Sun T, Cai M, Shen P (2010):** Cell-death-mode switch from necrosis to apoptosis in hydrogen peroxide treated macrophages., *Sci China Life Sci.*, 53, 1196-1203.
- **Liu SS (2010):** Mitochondrial Q cycle-derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics., *Ann N Y Acad Sci.*, 1201, 84-95.
- **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010):** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn*, 4, 118-126.
- **Lönn ME, Dennis JM, Stocker R (2012):** Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis., *Free Radic Biol Med.*, 53, 863-884.
- **Magder S (2006):** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?, *Crit Care*, 10, 208.
- **Matés JM (2000):** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology., *Toxicology.*, 163, 219.
- **McArdle A, Vasilaki A, Jackson M (2002):** Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms., *Ageing Res Rev.*, 1, 79-93.
- **Meisel H (1997):** Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins., *Biopolymers.*, 43, 119-128.

- **Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J (2008):** Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects., *Eur J Nutr.*, 47, 171-182.
- **Monostori P, Wittmann G, Karg E, Túri S (2009):** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 877, 3331-3346.
- **Moran LK, Gutteridge JM, Quinlan GJ (2001):** Thiols in cellular redox signalling and control., *Curr Med Chem.*, 8,763-772.
- **Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R (2005):** Polyphenols and glutathione synthesis regulation., *Am J Clin Nutr.*, 81, 277-283.
- **Mylonas C, Kouretas D (1999):** Lipid peroxidation and tissue damage., *In Vivo*, 13, 295-309.
- **Nagpal R, Behare P, Rana R, Kumar A, Kumar M, Arora S, Morotta F, Jain S, Yadav H (2011):** Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update., *Food Funct.*, 2, 18-27.
- **Nagpal R, Behare P, Rana R, Kumar A, Kumar M, Arora S, Morotta F, Jain S, Yadav H (2011):** Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update., *Food Funct.*, 2, 18 -27.
- **Natella F, Belelli F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C (2002):** Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans., *J Agric Food Chem.*, 50, 7720-7725.
- **Orrenius S (2007):** Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metab Rev.*, 39, 443-455.
- **Parodi PW (2007):** A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention., *Curr Pharm Des.*, 13, 813-828.
- **Peake J, Nosaka K, Suzuki K (2005):** Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans., *Exerc Immunol Rev.*, 11, 64-85.

- **Plant DR, Gregorevic P, Williams DA, Lynch GS (2001):** Redox modulation of maximum force production of fast-and slow-twitch skeletal muscles of rats and mice., *J Appl Physiol.*, 90, 832-838.
- **Powers SK, Lennon SL (1999):** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle., *Proc Nutr Soc.*, 58, 1025-1033.
- **Reboul E, Thap S, Tourniaire F, André M, Juhel C, Morange S, Amiot MJ, Lairon D, Borel P (2007):** Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption., *Br J Nutr.*, 97, 440-446.
- **Requena JR, Levine RL, Stadtman ER (2003):** Recent advances in the analysis of oxidized proteins., *Amino Acids.*, 25, 221-226.
- **Ricci I, Artacho R, Olalla M (2010):** Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity., *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 50, 390-402.
- **Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ (2005):** Bioactive peptides derived from food., *J AOAC Int.*, 88, 955-966.
- **Sen CK (2000):** Cellular thiols and redox-regulated signal transduction., *Curr Top Cell Regul.*, 36, 1-30.
- **Séverin S, Wenshui X (2005):** Milk biologically active components as nutraceuticals: review., *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 45, 645-656.
- **Shapiro HM (2003):** *Practical Flow Cytometry*, 4th Edition.
- **Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A (2000):** Oxidative stress in congestive heart failure, *Curr Cardiol Rep.*, 2, 206-211.
- **Singh S, Khan AR, Gupta AK (2012):** Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions., *J Exp Ther Oncol.*, 9, 303-316.

- **Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP (2013):** Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein., *Int J Pept.*
- **Slavin JL, Lloyd B (2012):** Health benefits of fruits and vegetables., *Adv Nutr.*, 3, 506-516.
- **Smithers GW, Ballard FJ, Copeland AD, De Silva KJ, Dionysius DA, Francis GL, Goddard C, Grieve PA, McIntosh GH, Udenigwe CC, Aluko RE (2012):** Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits., *J Food Sci.*, 77, 11-24.
- **Ursini F, Sevanian A (2002):** Wine polyphenols and optimal nutrition., *Ann N Y Acad Sci.*, 957, 200-209.
- **Urso ML, Clarkson PM (2003):** Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation., *Toxicology.*, 189, 41-54.
- **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. (2004):** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem.*, 266, 37-56.
- **Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C (2000):** Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics., *Br J Nutr.*, 91-98.
- **Walther B, Sieber R (2011):** Bioactive proteins and peptides in foods., *Int J Vitam Nutr Res.*, 81, 181-192.
- **Ward RE, German JB (2004):** Understanding milk's bioactive components: a goal for the genomics toolbox., *J Nutr.*, 134, 962S -967S.
- **Weiderpass E (2010):** Lifestyle and cancer risk. *J Prev Med Public Health.*, 43, 459-471.
- **Yanar K, Aydın S, Cakatay U, Mengi M, Buyukpınarbaşı N, Atukeren P, Sitar ME, Sönmez A, Uslu E (2011):** Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 109, 423-433.

- **Yang-Ming Tseng , Shu-Kai Lin, Jen-Kuei Hsiao, Ing-Jun Chen, Jang-Hwa Lee, Szu-Hsien Wu, Li-Yu Tsai (2006):** Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure., *Food and Chemical Toxicology*, 44, 574–578.
- **Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002):** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression., *Free Radic Biol Med.*, 33, 337-349.
- **Zhang H, Forman HJ (2012):** Glutathione synthesis and its role in redox signaling., *Semin Cell Dev Biol.*, 23, 722-728.
- **Zhang SJ, Bruton JD, Katz A, Westerblad H (2006):** Limited oxygen diffusion accelerates fatigue development in mouse skeletal muscle., *J Physiol.*, 572, 551-559.