



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

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΥΡΟΓΆΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ**  
**ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΆΓΟΝΤΑ NRF2**  
**ΣΕ ΜΥΪΚΆ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΚΑΙ ΣΕ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ**  
**ΚΥΤΤΑΡΑ EA.hy926»**

**ΤΖΙΜΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ**  
**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**  
**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NRF2 ΣΕ ΜΥΪΚΑ  
ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΚΑΙ ΣΕ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ EA.hy926»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Στάγκος:** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Άννα-Μαρία Ψαρρά:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## *Ευχαριστίες*

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την στήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τη Θάλεια Κερασιώτη για τη βοήθειά της.

## Πίνακας Περιεχομένων

Περιεχόμενα εικόνων .....	7
Περιεχόμενα γραφημάτων .....	8
1.1. Περίληψη.....	10
1.2. Abstract .....	12
2. Εισαγωγή.....	14
2.1. Ελεύθερες ρίζες κ Οξειδωτικό stress.....	14
2.1.1. Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	15
2.1.2 Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	16
2.1.3. Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ).....	16
2.1.4. Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ).....	17
2.1.5. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl).....	17
2.2. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) .....	17
2.2.1. Ενδοκυτταρικές πηγές .....	17
2.2.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση .....	17
2.2.1.β. Ουδετερόφιλα.....	19
2.2.1.γ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ .....	20
2.2.1.δ. Κυτόχρωμα P <sub>450</sub> .....	20
2.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων .....	21
2.2.2. Εξωγενείς πηγές .....	21
2.3. Βιολογική Δράση Των ROS.....	22
2.3.1. Ευεργετικές επιδράσεις.....	22
2.3.2. Επιβλαβείς επιδράσεις .....	23
2.4. Αντιοξειδωτικοί κυτταρικοί μηχανισμοί .....	25
2.4.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα .....	26

<b>2.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση</b>	<b>29</b>
.....	
<b>2.4.2.α. Γλουταθειόνη</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2.β. Θειοαναγωγάσες TRX</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2.γ. Βιταμίνη C</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2.δ. Βιταμίνη E</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2.ε. Καροτενοειδή</b>	<b>33</b>
<b>2.4.2.στ. Συνένζυμο Q 10</b>	<b>33</b>
<b>2.4.2.ζ. Σελήνιο</b>	<b>33</b>
<b>2.4.2.η. Μεταλλοθειονίνες</b>	<b>34</b>
<b>2.5. Οξειδωτικό Στρες</b>	<b>34</b>
<b>2.6. Μεταγραφικός Παράγοντας Nrf2</b>	<b>36</b>
<b>2.6.1. Οξυγενάση της Αίμης HO-1</b>	<b>40</b>
<b>2.6.2. Λιγάση γλουταμικής κυστεΐνης GCL</b>	<b>41</b>
<b>2.6.3. Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης GST</b>	<b>42</b>
<b>2.7. Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein)</b>	<b>44</b>
<b>2.7.1. Παρασκευή πρωτεΐνης τυρογάλακτος</b>	<b>44</b>
<b>2.7.2. Τα συστατικά της πρωτεΐνης τυρογάλακτος</b>	<b>45</b>
<b>2.7.3. Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος</b>	<b>48</b>
<b>3. Σκοπός πειράματος</b>	<b>50</b>
<b>4. Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Υλικά</b>	<b>50</b>
<b>4.1.1. Αντιδραστήρια</b>	<b>50</b>
<b>4.1.2.α. Κυτταρική σειρά EA.hy926</b>	<b>50</b>
<b>4.1.2.β. Μυϊκά κύτταρα C2C12</b>	<b>51</b>
<b>4.1.3. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926</b>	<b>52</b>

4.1.4. Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης της αιοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT GCS και της ενζυμικής δράσης της CAT, SOD και GST.....	52
4.1.5. Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος .....	53
4.1.6. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρολύματος.....	54
4.1.7. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford .....	54
4.1.8. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρολύματος.....	55
4.1.9. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS με τη μέθοδο Western blot .....	56
4.1.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT .....	63
4.1.11. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD .....	64
4.1.12. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST.....	65
4.2. Στατιστική ανάλυση .....	66
5. Αποτελέσματα .....	67
5.1. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS με τη μέθοδο Western blot .....	67
5.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT .....	69
5.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD .....	69
5.4. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST.....	69
6. Συζήτηση.....	85
7. Βιβλιογραφία.....	89

## Περιεχόμενα Εικόνων

**Εικόνα 1:** Η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών με τις ελεύθερες ρίζες

**Εικόνα 2:** Παραγωγή ελευθέρων ριζών απόPMN

**Εικόνα 3:** Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

**Εικόνα 4:** Λιπιδική και Πρωτεϊνική υπεροξειδωση

**Εικόνα 5:** Μηχανισμός δράσης της SOD

**Εικόνα 6:** Δομή γλουταθειόνης

**Εικόνα 7:** Οξειδωτικό στρες

**Εικόνα 8:** Δομή Nrf2

**Εικόνα 9:** Μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ Nrf2 και Keap 1

**Εικόνα 10:** Προτεινόμενοι μηχανισμοί μετατόπισης του Nrf2 από το κυτταρόπλασμα στον πηρύνα

**Εικόνα 11:** Ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω του Nrf2

**Εικόνα 12:** Ο προστατευτικός ρόλος της HO-1

**Εικόνα 13:** Λιγάση γλουταμικής κυστεΐνης (GCL) και Συνθετάση της γλουταθειόνης (GS)

**Εικόνα 14:** Τρανσφεράση της γλουταθειόνης

**Εικόνα 15:** Βιοσύνθεση γλουταθειόνης

**Εικόνα 16:** Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926

**Εικόνα 17:** Κυτταρική σειρά μυϊκών κυττάρων C2C12

## Περιεχόμενα Γραφημάτων

**Γράφημα 1:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 2:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 3:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 4:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 5:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 6:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 7:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 8:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 9:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 10:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 11:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 12:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

**Γράφημα 13:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 14:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926



**Γράφημα 15:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12

**Γράφημα 16:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

## 1.1. Περίληψη

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο οργανισμός παράγει ελεύθερες ρίζες οι οποίες εξουδετερώνονται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που διαθέτει. Όταν όμως διαταράσσεται η ισορροπία αυτή τότε προκαλείται οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα είτε να αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε να παρατηρείται μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες. Ο οργανισμός για να αντισταθμίσει τις επιβλαβείς επιδράσεις έχει αναπτύξει μηχανισμούς ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών αποκρίσεων. Μία από τις κύριες κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις είναι η επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω του κυτταροπλασματικού συστήματος ρύθμισης του οξειδωτικού στρες (Nrf2-Kear1) αφού ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι υπεύθυνος για την επαγωγή της έκφρασης πολλών σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ένα παραπροϊόν της παρασκευής τυριού παρουσιάζει ευγερτική δράση στον οργανισμό αφού ενισχύει την αντιοξειδωτική του άμυνα πιθανώς λόγω του πλούσιου περιεχομένου της σε κυστεΐνη μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής της σε γλουταθειόνη.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ενός αριθμού επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT, GCS καθώς και η ενζυμική δράση κάποιων επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και GST σε μυικά κύτταρα C2C12 και ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

Η πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Western blot ενώ η ενζυμική δράση των ενζύμων CAT, SOD και GST μετρήθηκαν με φασμαφωτομετρικές μεθόδους. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα του Nrf2, της SOD-1, της HO-1 και της CAT καθώς και την ενζυμική δράση της CAT, της SOD και της GST. Στα μυικά κύτταρα C2C12, τα επίπεδα του Nrf2 δεν επηρεάστηκαν ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα της SOD-1, της HO-1, της CAT και της GCS καθώς η ενζυμική δράση της CAT, της SOD και της GST.

Συμπερασματικά, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Στα EA.hy926 η επαγωγή αυτών των ενζύμων οφείλεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε ενεργοποίηση του Nrf2, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του από το κυτοσόλιο στον πυρήνα. Αντίθετα στα C2C12 κύτταρα δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του Nrf2 αλλά είχαμε αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι στα C2C12 ενεργοποιείται κάποιο άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στη μεταγραφή αυτών των γονιδίων και παρεμβάλεται στην ενεργοποίηση του Nrf2.

## ***1.2. ABSTRACT***

Normally the human body produces free radicals that are neutralized by available antioxidant mechanisms. However, when this balance is disturbed it is inducing oxidative stress leading either to increased free radical generation either to decreased antioxidant capacity. Oxidative stress is closely linked to many pathological situations, which is a result of the cellular effects of stress. The agency to offset the harmful effects has developed mechanisms of activation of antioxidant responses. One of the main antioxidant cell responses is the induction of antioxidant enzymes by the cytosolic system of oxidative stress (Nrf2-Keap1) since the transcription factor Nrf2 is responsible for induction of expression of many important antioxidant enzymes and cytoprotective proteins.

The whey protein, a byproduct of cheese presents positive action in the human body which enhances the antioxidant defense probably because of the rich content of cysteine through intracellular conversion into glutathione.

In the present study we investigated the effect of the whey protein on protein expression of the transcription factor Nrf2, of some induced antioxidant enzymes SOD-1, HO-1, CAT, GCS and the enzymatic activity of some induced antioxidant enzymes CAT, SOD and GST in C2C12 muscle cells and endothelial cells EA.hy926.

The protein expression of the transcription factor Nrf2 and the enzymes SOD-1, HO-1, CAT and GCS was determined by the Western blot method and the enzymatic activity of the enzyme CAT, SOD and GST were measured by spectrophotometric methods. In endothelial cells EA.hy926, it is found that whey protein increased levels of Nrf2, SOD-1, HO-1 and CAT and the enzymatic activity of CAT, SOD and GST. In muscle cells C2C12, Nrf2 levels were unaffected while levels of SOD-1, the HO-1, the CAT and the GCS as well as the enzymatic activity of CAT, the SOD and GST were increased.

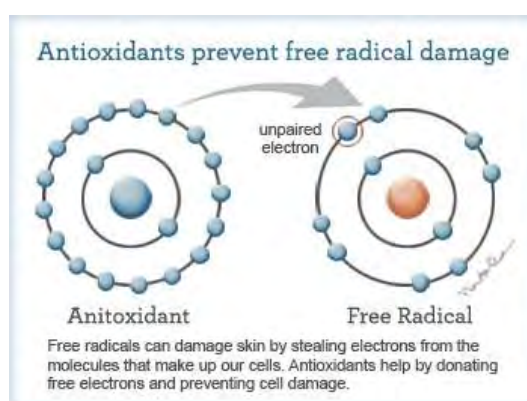
In conclusion, the whey protein has led to activation of the antioxidant enzymes and the metabolism enzymes of phase II in both C2C12 muscle cells and endothelial cells EA.hy926. In EA.hy926 the induction of these enzymes due to the fact that whey protein has led to activation of Nrf2, resulting in displacement from the cytosol to the nucleus. Conversely C2C12 cells was observed activation of Nrf2 but the antioxidant enzymes and metabolism enzymes of phase II were increased, and

this may be due to the fact that C2C12 cells are activating another signal path leading to the transcription of these genes and it is inserted in the activation of Nrf2.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1. Ελεύθερες ρίζες κ Οξειδωτικό stress

Γενικά η ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως ένα άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης, το οποίο αποτελείται από ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η έννοια του ασύζευκτου ηλεκτρονίου υποδηλώνει ότι ένα ηλεκτρόνιο κινείται μόνο του σε μία τροχιά, γύρω από τον πυρήνα του ατόμου, σε αντίθεση με το σύνηθες φαινόμενο της ύπαρξης δύο ηλεκτρονίων σε κάθε τροχιά. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ρίζες οξυγόνου ιδιαίτερη δραστηριότητα και μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να λάβουν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως οξειδωτικές ή αναγωγικές ουσίες (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1990).



Εικόνα 1 : Η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών με τις ελεύθερες ρίζες

Αρκετές ελεύθερες ρίζες είναι ή προέρχονται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και από τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παρουσιάζουν ευεργετικές αλλά και βλαβερές ιδιότητες για τα κύτταρα και τους οργανισμούς (Valko, 2006). Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου απαντώνται στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Από την άλλη, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου μπορούν να προκαλέσουν βιολογική βλάβη, στον οργανισμό γνωστή και ως οξειδωτικό stress.

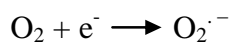
Το οξειδωτικό stress συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα και ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Klatt , 2000).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ( $O_2^{\cdot-}$ ), του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^{\cdot}$ ) και του υδροπεροξυλίου ( $HO_2^{\cdot}$ ). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3^{\cdot}$ ), οι θειούχες ρίζες ( $RS^{\cdot}$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ).

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου  $NO^{\cdot}$  και το διοξείδιο του αζώτου  $NO_2^{\cdot}$  καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ  $HNO_2$  και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου  $ONOO^-$ ) (Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

### **2.1.1. Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )**

Δημιουργείται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα  $e^-$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



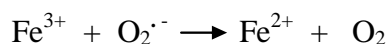
Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να δημιουργηθεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο  $O_2$  από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου, όπως επίσης και να σχηματιστεί από φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια της δράσης τους.

Μικρότερες ποσότητες  $O_2^{\cdot-}$  παράγονται σαν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από διαφορετικούς τύπους κυττάρων όπως ενδοθηλιακών, ινοβλαστών και λεμφοκυττάρων. Το ανιόν σουπεροξειδίου παράγεται επίσης από τη δράση της

οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τέλος σε ουρικό οξύ.

### **2.1.2. Ρίζα υδροξυλίου (OH·)**

Έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες ότι πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Σχηματίζεται σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999).

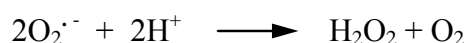


Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπρούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση αυτή. Η ρίζα υδροξυλίου αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα αμινοξέα και τα μέταλλα. Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας αυτής είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

### **2.1.3. Υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )**

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Μερικές από αυτές είναι οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Ακόμα δημιουργείται και με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου

SOD





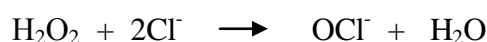
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή της ρίζας του υδροξυλίου OH<sup>•</sup>. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων.

#### **2.1.4. Μονήρες οξυγόνο (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)**

Το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (singlet oxygen) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Γεγονός που αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του αφού αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα συμπεριλαμβανομένων της κυστεΐνης, της μεθειονίνης, της τρυπτοφάνης και της ιστιδίνης. Αποτελεί το σημαντικότερο καταλύτη έναρξης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

#### **2.1.5. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)**

Σχηματίζεται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με το χλώριο (Cl) και είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το O<sub>2</sub><sup>•-</sup>



## **2.2. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS)**

Οι πηγές παραγωγής ROS χωρίζονται σε εξωγενείς και ενδογενείς.

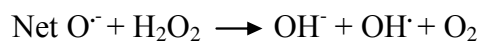
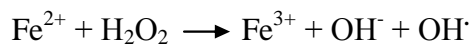
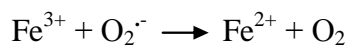
### **2.2.1. Ενδοκυτταρικές πηγές:**

#### **2.2.1.a. Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Η Οξειδωτική φωσφορυλίωση παρατηρείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται μια από τις σημαντικότερες ενδοκυτταρικές πηγές ROS. Γενικά, η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979). Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και  $FADH_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\cdot-}$  (Chance et al., 1979). Το  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\cdot-}$  και στο  $H_2O_2$  δημιουργείται  $OH^{\cdot}$ .

#### Αντίδραση Haber-Weiss:



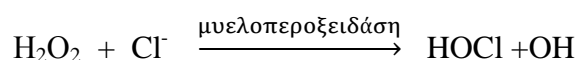
Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^-$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $OH^{\cdot}$  και  $NO_2^{\cdot}$ .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη ( $UQH_2$ ) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης ( $UQH$ ), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Boveris and Cadenas, 1997).

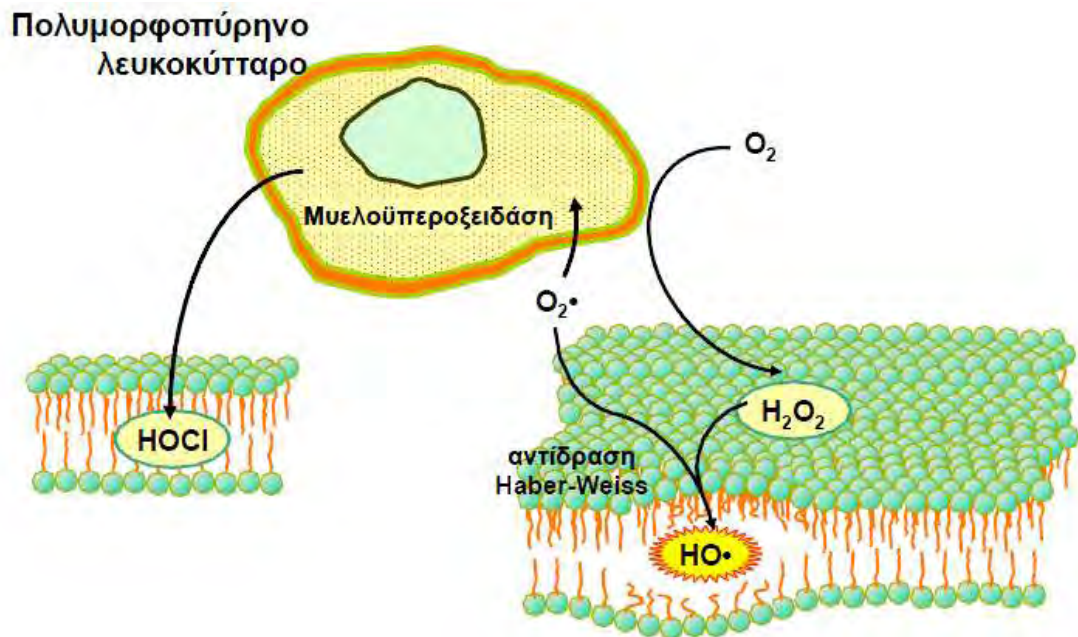
### 2.2.1.β. Ουδετερόφιλα

Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του αίματος που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα PMN (Meydani and Evans, 1979). Κατά την οξεία φάση της αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην τραυματισμένη περιοχή καθώς προσελκύνονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα και το  $O_2^{\cdot-}$  κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται από τη μυελοπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petroni et al., 1992). Η κυτταροπλασματική υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $OH^{\cdot}$  από ιόντα μετάλλων ή σε  $HOCl$ .



Έτσι, η αντίδραση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και στην παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης. Παρ' όλα αυτά, από τα ουδετερόφιλα ελευθερώνονται ROS και άλλα οξειδωτικά τα οποία μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani and Evans, 1979; Meydani et al., 1992).



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN

### 2.2.1.γ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Πολλές ελεύθερες ρίζες παράγονται και από τις αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης (Downey, 1990; Kuppasamy and Zweier, 1989). Στην ισχαιμία το ATP απαμινώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^{\cdot-}$ . Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το  $Ca^{2+}$  ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

### 2.2.1.δ. Κυτόχρωμα $P_{450}$

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα του ήπατος παράγουν ελεύθερες μορφές οξυγόνου μέσω του κυτοχρώματος  $P_{450}$  (Yu, 1994).

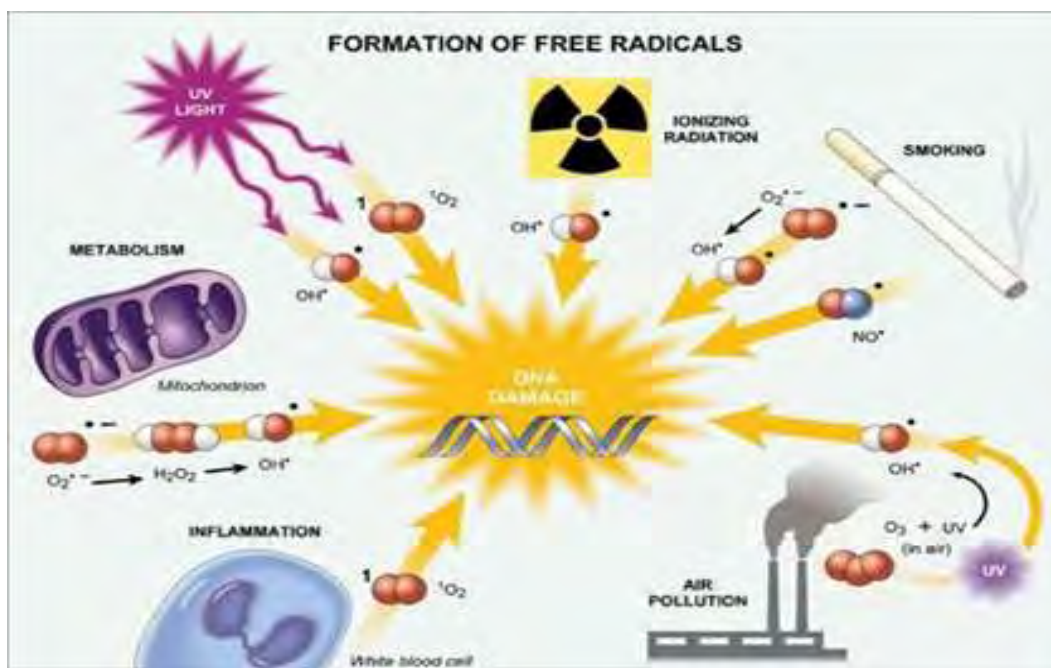
Το NADPH οξειδώνεται και δημιουργείται  $O_2^{\cdot-}$  το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του  $H_2O_2$  είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και  $Fe^{3+}$  η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο  $O_2$  παράγοντας  $O_2^{\cdot-}$ . Η NADPH οξειδάση βρίσκεται, εκτός από την μεμβράνη του πλάσματος και σε άλλα κυτταρικά συστατικά όπως τα μιτοχόνδρια.

### **2.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων**

Κάποια μόρια όπως οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )

### **2.2.2. Εξωγενείς πηγές :**

Σημαντικοί εξωγενείς οξειδωτικοί παράγοντες θεωρούνται η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα (Koren, 1995; Victoria, 1994). Σημαντικό ρόλο στη παραγωγή ελευθέρων ριζών παίζει και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999) καθώς επίσης η δράση διαφόρων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000).



Εικόνα 3: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

## 2.3. Βιολογική Δράση Των ROS

### 2.3.1. Ενεργητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδο- όσο και διακυτταρικά (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηρότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες. Επίσης, οι δραστικές μορφές οξυγόνου ROS συμμετέχουν σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης (Finaud et al., 2006) και ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001; Linnane et al., 2002). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ η αύξηση της παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, τα αιμοπετάλια που βρίσκονται

σε περιοχή με φλεγμονή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση επιπλέον αιμοπεταλίων και λευμοκυττάρων στην περιοχή. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

### ***2.3.2. Επιβλαβείς επιδράσεις***

Όλα τα βιολογικά μακρομόρια που υπάρχουν στο σώμα μας βρίσκονται σε κίνδυνο να προσβληθούν από τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες τα καταστρέφουν και αυτό μπορεί να οδηγήσει στη μειωμένη λειτουργία αλλά ακόμη και στο θάνατο του κυττάρου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δραματικές επιπτώσεις στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού.

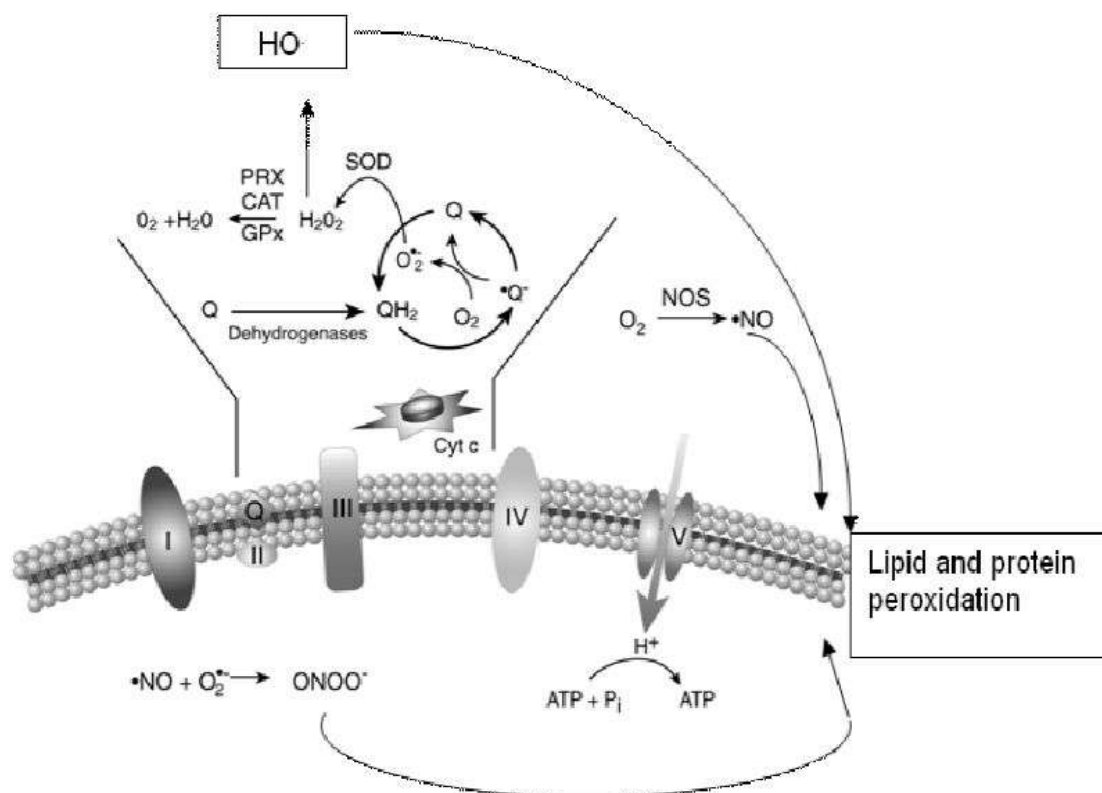
#### *Λιπίδια και Λιπιδική Υπεροξειδωση*

Η κυτταρική μεμβράνη που αποτελεί βασικό συστατικό των κυτταρικών οργανιδίων είναι ιδιαίτερα ευάλωτη σε πιθανή προσβολή των ελεύθερων ριζών. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν στα λιπίδια το κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, λιπιδική υπεροξειδωση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αυτής μαζί με την οξειδωση των λιπαρών οξέων σχηματίζεται και ένας μεγάλος αριθμός τοξικών παραπροϊόντων με βλαβερές συνέπειες για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου ( Devasagayam et al 2003 ).

Η λιπιδική υπεροξειδωση των παρουσιάζει τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO· κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1999).

## Πρωτεΐνες

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ROS ή οι δραστικές μορφές αζώτου RNS αντιδρούν με τις πρωτεΐνες προκαλώντας πρωτεϊνική υπεροξείδωση, ιδιαίτερα κατά την αλληλεπίδραση με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Stadtman, 1992). Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή εμφανίζοντας αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό καθώς και θρυμματισμός του. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).



Εικόνα 4: Λιπιδική και Πρωτεϊνική υπεροξείδωση



## Υδατάνθρακες

Οι ελεύθερες ρίζες, όπως το ανιόν υδροξυλίου  $\bullet$  OH αντιδρούν με τους υδατάνθρακες αφαιρώντας τυχαία ένα άτομο υδρογόνου από ένα άτομο άνθρακα, παράγοντας μία ρίζα άνθρακα. Αυτό οδηγεί στη προσβολή σημαντικών υδατανθράκων όπως το υαλουρονικό οξύ, δομικό συστατικό του οργανισμού που απαντάται για παράδειγμα στο αρθρικό υγρό που περιβάλλει τις αρθρώσεις. Έτσι κατά τη διάρκεια μια φλεγμονής η συσσώρευση και η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων αυξάνουν τη παραγωγή ελευθέρων ριζών, γεγονός που εμπλέκεται κ στη δημιουργία ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

## DNA

Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ελεύθερες ρίζες, όπως  $\bullet$  OH και  $H \bullet$  αντιδρούν με το DNA με προσθέτοντας ή αφαιρώντας άτομα υδρογόνου από τις χαρακτηριστικές βάσεις. Έτσι η ρίζα υδροξυλίου ( $OH\bullet$ ) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυδιογουανοσίνη (8-OHdG). Ακόμα μπορεί να επιτεθεί και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματιστεί η 8-υδροξυαδενίνη. Τέλος, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων τέτοιων προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).

### **2.4. Αντιοξειδωτικοί κυτταρικοί μηχανισμοί**

Η συνεχής έκθεση στις βλαβερές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, όπως προληπτικοί μηχανισμοί, μηχανισμοί επιδιόρθωσης και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

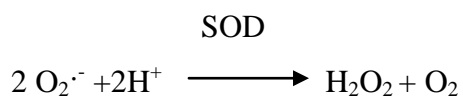
Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπών τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

### **2.4.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα**

Καταλύουν τη διάσπαση των ROS στο ενδοκυττάριο περιβάλλον.

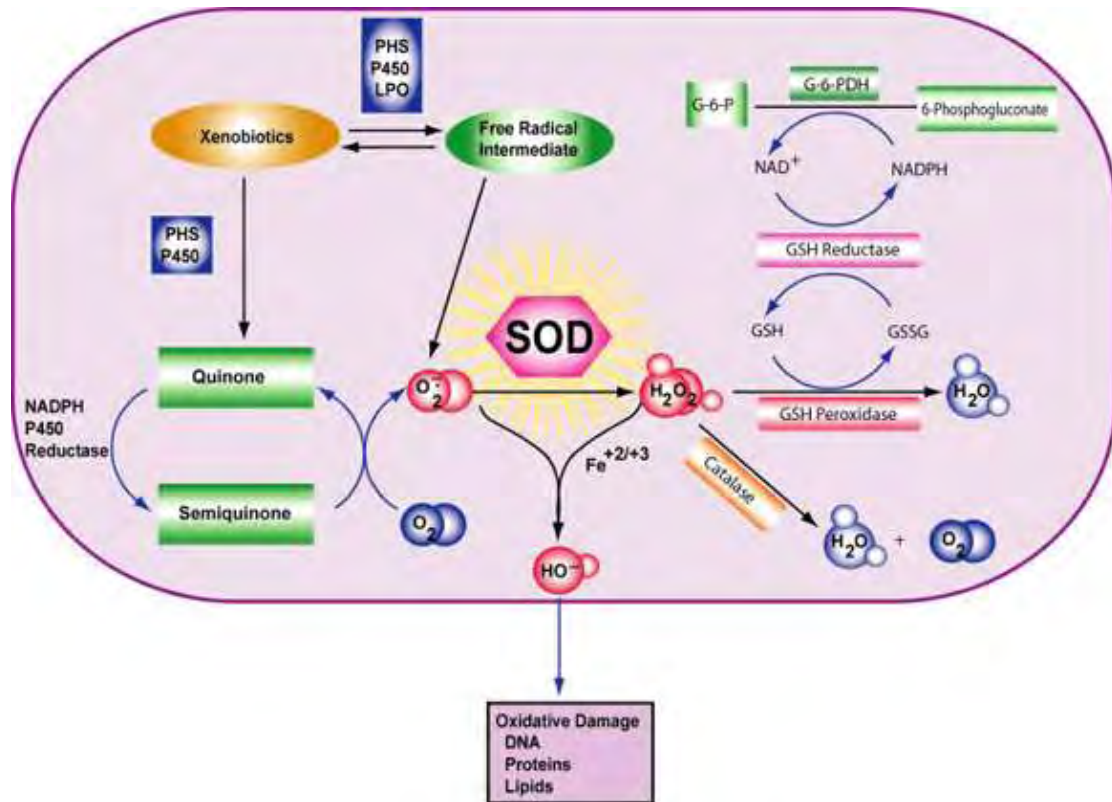
#### Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου, καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου



Αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1939 και μόλις το 1969 οι McCord και Fridovich απέδειξαν την αντιοξειδωτική δράση της SOD. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντάται σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον

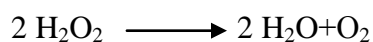
αριθμό των υπομονάδων, τους συμπαράγοντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις ισομορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZnSOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Η SOD καταστρέφει τις  $O_2^-$  με απίστευτα υψηλές ταχύτητες αντίδρασης με τη διαδοχική οξείδωση και την αναγωγή του μετάλλου του ενεργού κέντρου.



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης της SOD

### Καταλάση (CAT)

Η καταλάση παρουσιάζεται σε αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς αλλά δεν ανευρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο σε δύο στάδια



Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε λεπτό.

### Ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης

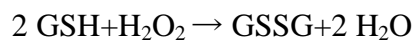
Καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια πηγή της φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο NADPH.

### Αναγωγή της γλουταθειόνης

Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ολική ενδοκυττάρια γλουταθειόνη. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH.

### Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs).

Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αναγνωρίστηκε από τον Mills το 1957 και αποδόθηκε το 1973 σε ένα σεληνοένζυμο από τους Flohe et al και Rotruck et al. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο GPxs, ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (glutathione S-transferase GST). Σήμερα είναι πλέον γνωστές τέσσερις διαφορετικές GPxs (GPxs1-4) στα θηλαστικά. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη



Αν και η αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστικότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστικότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων.

#### **2.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση**

Όταν μια δραστική ρίζα αντιδρά με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλους στόχους προς παραγωγή ακόμη περισσότερων ριζών. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, η οποία συνεχίζεται έως ότου δύο ρίζες ενωθούν προς σταθερό προϊόν ή εξουδετερωθούν από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Τα λιποδιαλυτά και τα υδατοδιαλυτά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση είναι μικρά μόρια όπως η γλουταθειόνη και η βιταμίνη E που μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν

ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Η αντίδραση οδηγεί σε οξείδωση του αντιοξειδωτικού, το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Εξ ορισμού, η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια.

#### **2.4.2.α. Γλουταθειόνη**

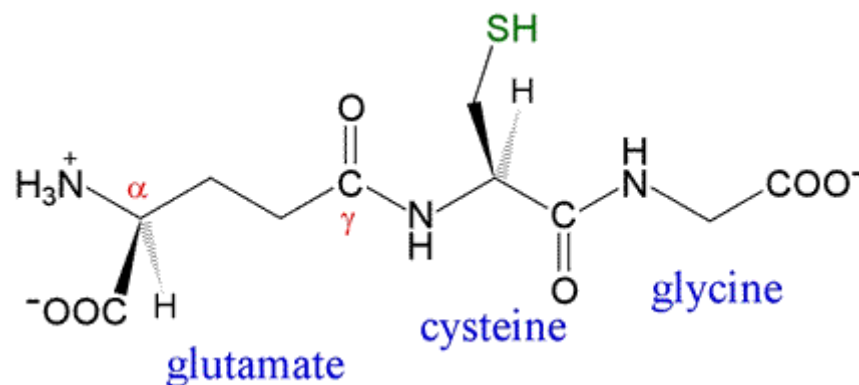
Η γλουταθειόνη, είναι ένα τριπεπτίδιο με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Masella et al., 2005). Απαντάται είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της (Jamieson Dj, 1998). Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού (Nogueira et al., 2004).

Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε stress, το μεγαλύτερο μέρος (99%) αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε αναχθείσα μορφή. Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα αμινοξέα L-γλουταμικό, L-κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο διαδοχικά βήματα, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθετάση της γλουταθειόνης. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία (Arrigo, 1999). Στον πυρήνα, η γλουταθειόνη διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA.

Οι κύριες προστατευτικές δράσεις της γλουταθειόνης στο οξειδωτικό stress είναι οι εξής:

- Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης και αφυδρογονάση φορμαλδεϋδης.

- Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Δεσμεύει άμεσα τη ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.
- Έχει την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό μορφή σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E με άμεσο ή έμμεσο τρόπο. Η ικανότητα αυτή καθορίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ζεύγους GSH/2GSSG (Pastore et al.,2003).



Εικόνα 6: Δομή γλουταθειόνης

#### 2.4.2.β. Θειοαναγωγάσες TRX

Οι θειοαναγωγάσες είναι μικρές σουλφυδρικές πρωτεΐνες με δραστηριότητα οξειδοαναγωγάσης. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί τρία γονίδια θειορεδοξίνης (TRX1, TRX2 και sp TRX, η οποία παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα σπερματοζώαρια). Οι TRX όλων των οργανισμών διαθέτουν ένα εξελικτικά συντηρητικό ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Cys-Gly-Pro-Cys. Ειδικοί πρωτεϊνικοί δισουλφιδικοί στόχοι αναγωγής από την ομάδα των TRX είναι πρωτεΐνες όπως η ριβονουκλεοτιδική αναγωγάση, η δισουλφιδική ισομεράση και αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των p53, NF-κB και AP-1.

Επιπλέον, οι TRX αποτελούν δότες ηλεκτρονίων για πολλές υπεροξειδοαναγωγάσες, ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγωγή των υπεροξειδίων. Επιπλέον, αυτή η μικρή πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να ανάγει μερικές δραστικές ρίζες οξυγόνου καθώς και να αναδιπλώσει οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίσης, επάγει αυτοκρινείς δράσεις ανάλογες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών.

#### **2.4.2.γ. Βιταμίνη C**

Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου. Επίσης, συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη E και το σελήνιο. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι ιδιαίτερα έκδηλη στους πνεύμονες και στο φακό του ματιού (Halliwell, 1996).

#### **2.4.2.δ. Βιταμίνη E**

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και τη συναντάμε σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη E λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση (Buettner, 1993).



#### **2.4.2.ε. Καροτενοειδή**

Πρόκειται για χρωστικές, που βρίσκονται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο (Edge et al., 1997).

#### **2.4.2.στ. Συνένζυμο Q 10**

Το συνένζυμο Q 10 (ουβικινόνη) λαμβάνει χώρα στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξειδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης.

#### **2.4.2.ζ. Σελήνιο**

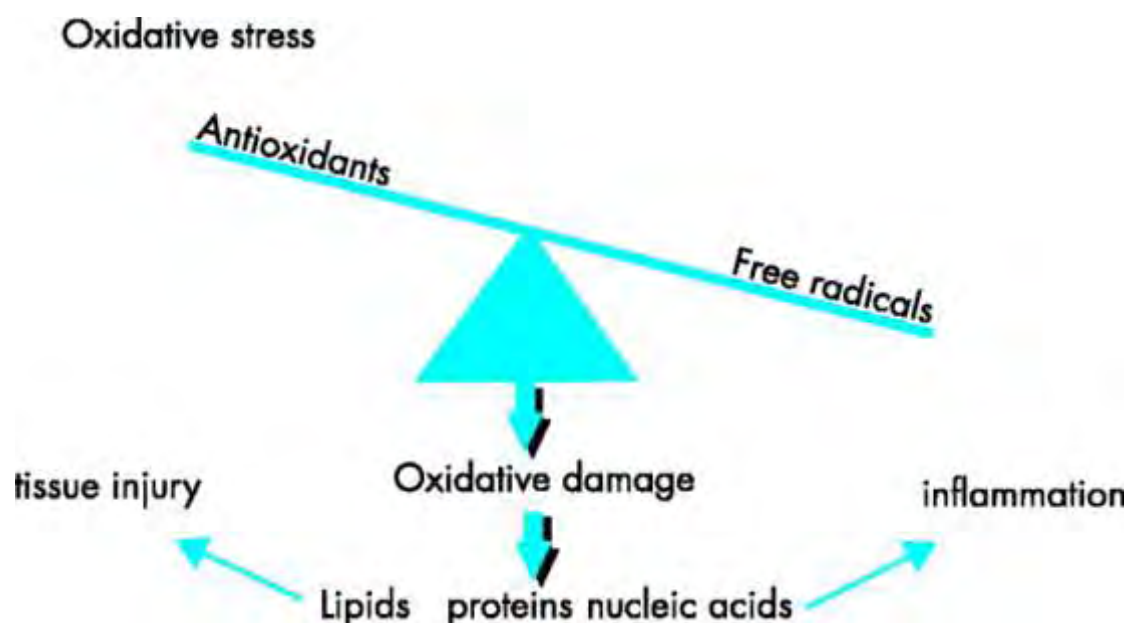
Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού και στην πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Ως συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

### 2.4.2.η. Μεταλλοθειονίνες

Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του χαλκού και του ψευδαργύρου, στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο χαλκός Cu.

### 2.5. Οξειδωτικό Στρες

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο οργανισμός παράγει ελεύθερες ρίζες οι οποίες εξουδετερώνονται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που διαθέτει. Όταν όμως διαταράσσεται η ισορροπία αυτή τότε προκαλείται οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα είτε να υπερπαράγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται σε εξωγενείς ή και σε ενδογενείς παράγοντες:

1) Εξωγενείς πηγές:

- Περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής)
- Ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική)
- Βαριά σωματική άσκηση
- Κάπνισμα, αλκοόλ, κακή διατροφή
- Τοξικές ουσίες

2) Ενδογενείς πηγές:

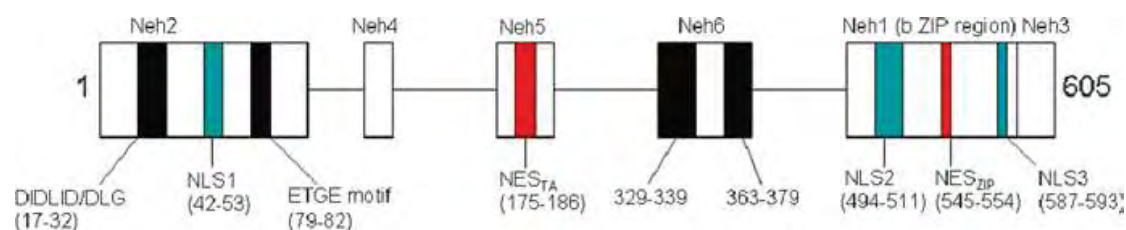
- Μιτοχόνδρια
- Ενδοπλασματικό δίκτυο
- Κυτταρόπλασμα
- Βιολογικές μεμβράνες

Το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες. Έτσι σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών ασθενειών όπως η αθηροσκλήρυνση η καρδιακή ανεπάρκεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, σχετίζονται με το οξειδωτικό stress (Kojoda et al., 1999). Η φλεγμονή, ορισμένες μορφές καρκίνου και η διεργασία της γήρανσης έχουν αποδοθεί εν μέρει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Ashok Bt et al, 1999). Τέλος, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων αποδίδονται στο οξειδωτικό στρες (Galati et al., 2002).

Ο οργανισμός για να αντισταθμίσει τις παραπάνω επιβλαβείς επιδράσεις έχει αναπτύξει μηχανισμούς ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών αποκρίσεων. Μία από τις κύριες κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις είναι η επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω του κυτταροπλασματικού συστήματος ρύθμισης του οξειδωτικού στρες (Nrf2-Keap1).

## 2.6. Μεταγραφικός Παράγοντας Nrf2

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor2) είναι υπεύθυνος για την επαγωγή της έκφρασης πολλών σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών. Ανήκει στην οικογένεια NF-E2. Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από μια δομή φερμουάρ λευκίνης. Ο Nrf2 (66-kDa πρωτεΐνη) εκφράζεται παντού με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στους νεφρούς, τους μύες, τον πνεύμονα, την καρδιά, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Περιλαμβάνει 6 περιοχές που είναι υψηλά διατηρημένες μεταξύ των διαφόρων ειδών και ονομάζονται Nrf2-ECH homology (NEH) 1-6 περιοχές. Η Neh1 είναι μια CNC-bZIP περιοχή που επιτρέπει στον Nrf2 να ετεροδιμερίζεται με μικρές Maf πρωτεΐνες. Η Neh2 επιτρέπει την πρόσδεση του Nrf2 στον κυτταροπλασματικό καταστολέα Keap1. Η Neh3 είναι μια C-τελική περιοχή και παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του Nrf2. Η Neh4 και η Neh5 περιοχή ενεργούν από κοινού για να δεσμευτούν στον συνενεργοποιητή CBP. Η Neh6 εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του Nrf2 που συμβαίνει στον πυρήνα οξειδωτικά στρεσαρισμένων κυττάρων.

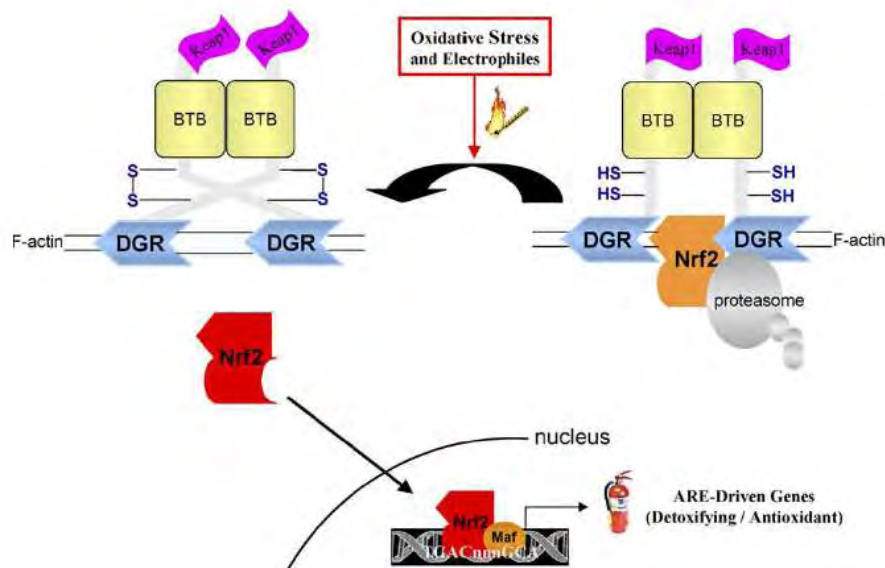


Εικόνα 8: Δομή Nrf2

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο Nrf2 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή μη ενεργού συμπλόκου με την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like EC-associated protein 1). Η Keap1 είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 69 kDa, αποτελείται από πέντε υπομονάδες, μια περιοχή N-τερματισμού (NTR), μια περιοχή συμπλόκου με αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (BTB) που συχνά σχηματίζει σύμπλοκα με άλλους τομείς BTB, μια περιοχή (IVR) πλούσια σε κυστεΐνη, μια περιοχή με διπλή επανάληψη γλυκίνης ή Kelch (DGR), που αποτελείται από έξι μοτίβα Kelch και τέλος μια περιοχή C-τερματισμού (CTR), (Dinkova-Kostova et al., 2002). Οι

επαναλήψεις Kelch δημιουργούν μία δομή β-έλικας. Η επανάληψη αυτή της Keap1 δημιουργεί σύμπλοκο με τον Nrf2 μέσω της υπομονάδας του, Neh2.

Στα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα παρατηρείται η αποσύνδεση του Nrf2 από την Keap1, επιτρέποντας του έτσι να μετακομίσει στον πυρήνα. Εκεί αλληλεπιδρά με μια μικρή πρωτεΐνη Maf, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές που δεσμεύεται με το στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης ARE (antioxidant response element) ή με το ηλεκτρόφιλο στοιχείο απόκρισης (ErRE) τα οποία βρίσκονται στη περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων αλλά και ενζύμων του μεταβολισμού της φάσης 2, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους (Numazawa et al., 2004).



Εικόνα 9: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ Nrf2 και Keap 1

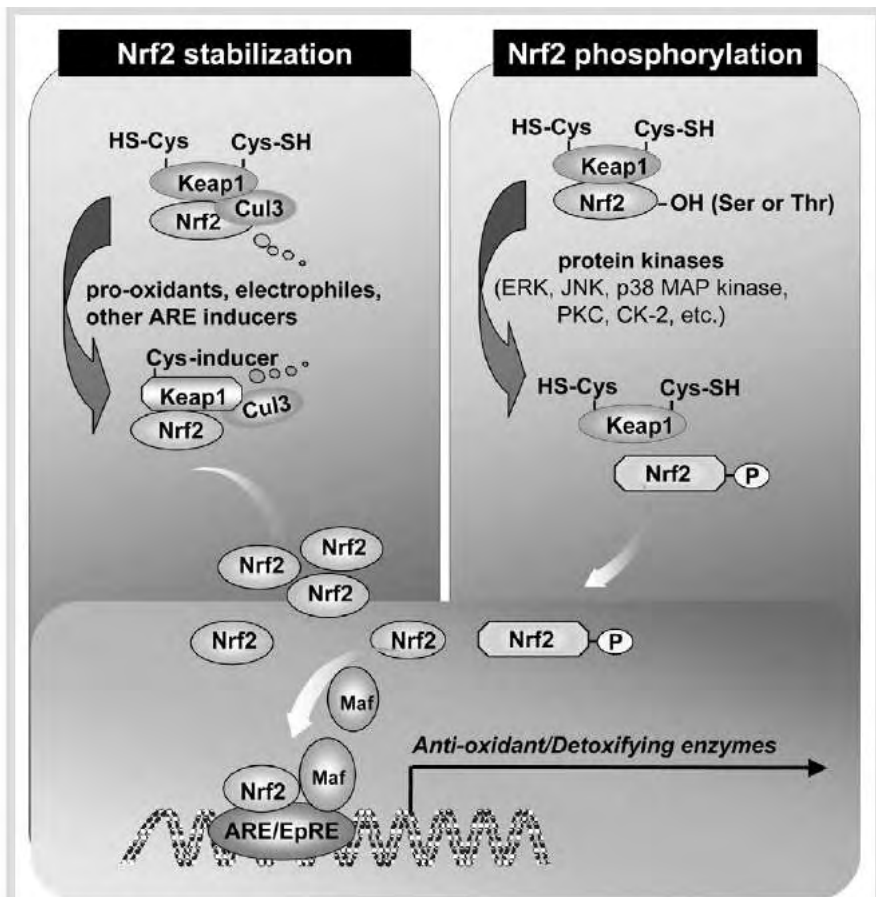
Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται με την παρουσία παραγόντων επαγωγής του στοιχείου ARE όπως προξειδωτικά και ηλεκτρονιόφιλα και περιγράφεται με τουλάχιστον δύο πιθανούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την αποδέσμευση του Nrf2 μέσω της τροποποίησης της πρωτεΐνης Keap1 και τη φωσφορύλιωση του Nrf2 από κινάσες.

Στην πρώτη περίπτωση, η Keap1 σε φυσιολογικές συνθήκες αποτελεί υπόστρωμα δημιουργώντας ένα σύμπλοκο Cul3-Keap1 εξαρτώμενο από την λιγάση ουβικιτίνης. Η Keap1 δεσμεύοντας τον Nrf2 εξασφαλίζει την ουβικιτίνη απαραίτητη για τη δημιουργία του συμπλόκου και έτσι παρεμποδίζει τον μεταγραφικό παράγοντα να μετακομίσει στη πυρήνα. Μερικοί επαγωγείς οξειδωτικού στρες (προξειδωτικά, ηλεκτρονιόφιλα) μπορεί να τροποποιήσουν την κυστεΐνη Cys151 της Keap1 και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στην τριτοταγή διαμόρφωση της Keap1, έτσι μειώνεται η συγγένεια του Nrf2 με την Keap1, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ο Nrf2. Η ομοιοπολική τροποποίηση λοιπόν, ή η οξείδωση της Keap1 επιτρέπει στον Nrf2 να αποδεσμεύεται και να μετατοπίζεται στον πυρήνα.

Στη δεύτερη περίπτωση, ενεργοποιούνται πρωτεϊνικές κινάσες, όπως PKC, JNK, ERK οι οποίες επάγουν τη φωσφορυλίωση της σερίνης Ser27 ή της θρεονίνης Thr26 του Nrf2 και έχουν σαν αποτέλεσμα την αποδέσμευση του Nrf2 από την Keap1 και την συσσώρευσή του στον πυρήνα.

Εκτός από αυτούς τους δύο μηχανισμούς υπάρχει και η υπόθεση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης Tyr141 που βρίσκεται στο ευρύ σύμπλοκο (BTB) και καθιστά τη Keap1 σταθερή, ενώ η αποφωσφορυλίωσή της προάγει την ταχεία αποικοδόμηση της Keap1 με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται ο Nrf2 και να μεταφλερεται στον πυρήνα (Jain et al., 2008).

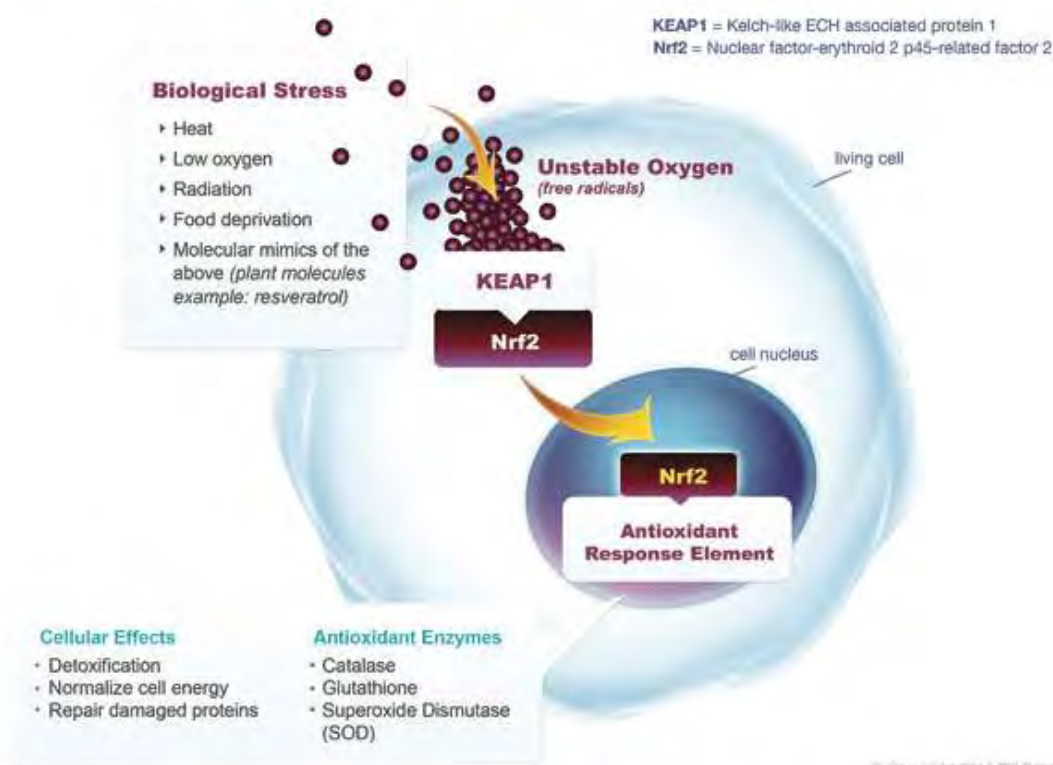
Ένας άλλος μηχανισμός αποδέσμευσης του Nrf2 έχει πρόσφατα μελετηθεί από τους Clements et al, 2006. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη DJ-1/PARK7 που συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου και την ασθένεια του Πάρκινσον αναστέλλει το σύμπλοκο Nrf2-Keap1 και προάγει την αποδέσμευση του Nrf2 και την μετακόμισή του στον πυρήνα.



Εικόνα 10: Προτεινόμενοι μηχανισμοί μετατόπισης του Nrf2 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα

Ο Nrf2 προάγει την ενεργοποίηση του του στοιχείου αντιοξειδωτικής απόκρισης ARE (antioxidant response element) ή του ηλεκτρόφιλου στοιχείου απόκρισης EpRE (electrophile responsive element) προάγοντας έτσι την έκφραση των ενζύμων του μεταβολισμού της φάσης 2 δηλαδή τη τρανσφεράση της γλουταθειόνης, την οξυγενάση της αίμης, την λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης και πολλων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση, η αναγωγή της γλουταθειόνης και η δισμουτάση του υπεροξειδίου.

## Activation Of Cellular Survival Mechanisms Via Nrf2



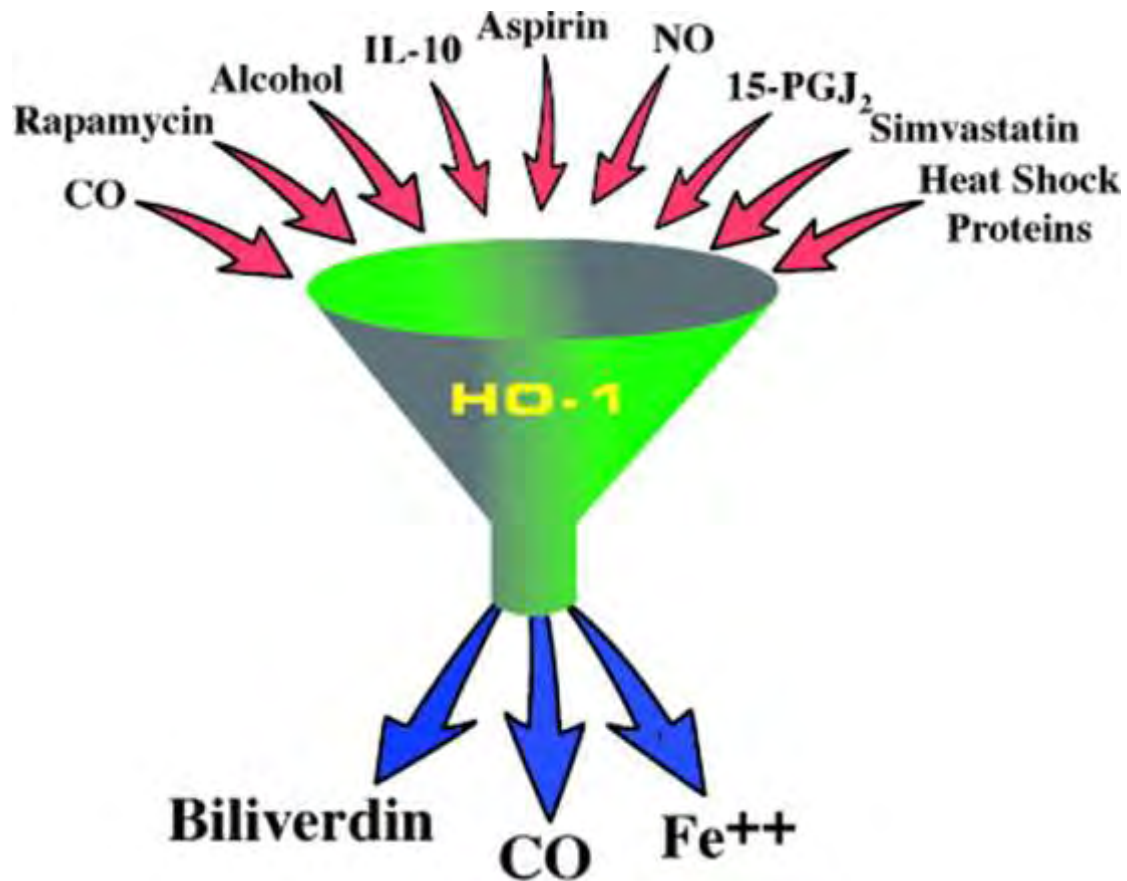
Εικόνα 11: Ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω του Nrf2

### 2.6.1. Οξυγενάση της Αίμης HO-1

Η οξυγενάση της αίμης HO-1, είναι ένα από τα τρία ισοένζυμα της οικογένειας οξυγονάσης της αίμης (HO) που καταλύουν την αποικοδόμηση της αίμης σε χολοπρασίνη (biliverdin), δισθενή σίδηρο και μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Η χολοπρασίνη (biliverdin) καταλύεται σε χολερυθρίνη (bilirubin), μέσα από από τη δράση του ενζύμου ρεδουκτάση της χολοπρασίνης (biliverdin reductase). Η χολοπρασίνη είναι προϊόν του καταβολισμού της αίμης και αποτελεί μία πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η ρεδουκτάση της χολοπρασίνης αφαιρεί το διπλό



δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρροπολικού δακτυλίου. Στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπράσινη. Αυτή η κυκλική διαδικασία, σε συνδυασμό με τη δραστική αντιοξειδωτική λειτουργικότητα της χολερυθρίνης αιτιολογεί την αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική της δράση. (Soares et al., 2001).

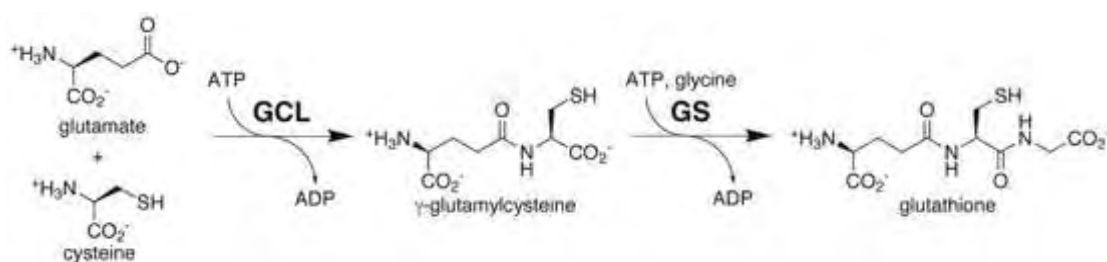


Εικόνα 12: Ο προστατευτικός ρόλος της HO-1

### 2.6.2. Λιγάση γλουταμικής κυστεΐνης GCL

Η λιγάση GCL είναι γνωστή και ως συνθετάση της γ- γλουταμυλκυστεΐνης (γ-GCS). Γενικά η σύνθεση της γλουταθειόνης GSH ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της λιγάσης (GCL), τη διαθεσιμότητα κυστεΐνης και την αντίστροφη αναστολή της γλουταθειόνης GSH (Griffith, 1999). Η GCL είναι ένα ετεροδιμερές

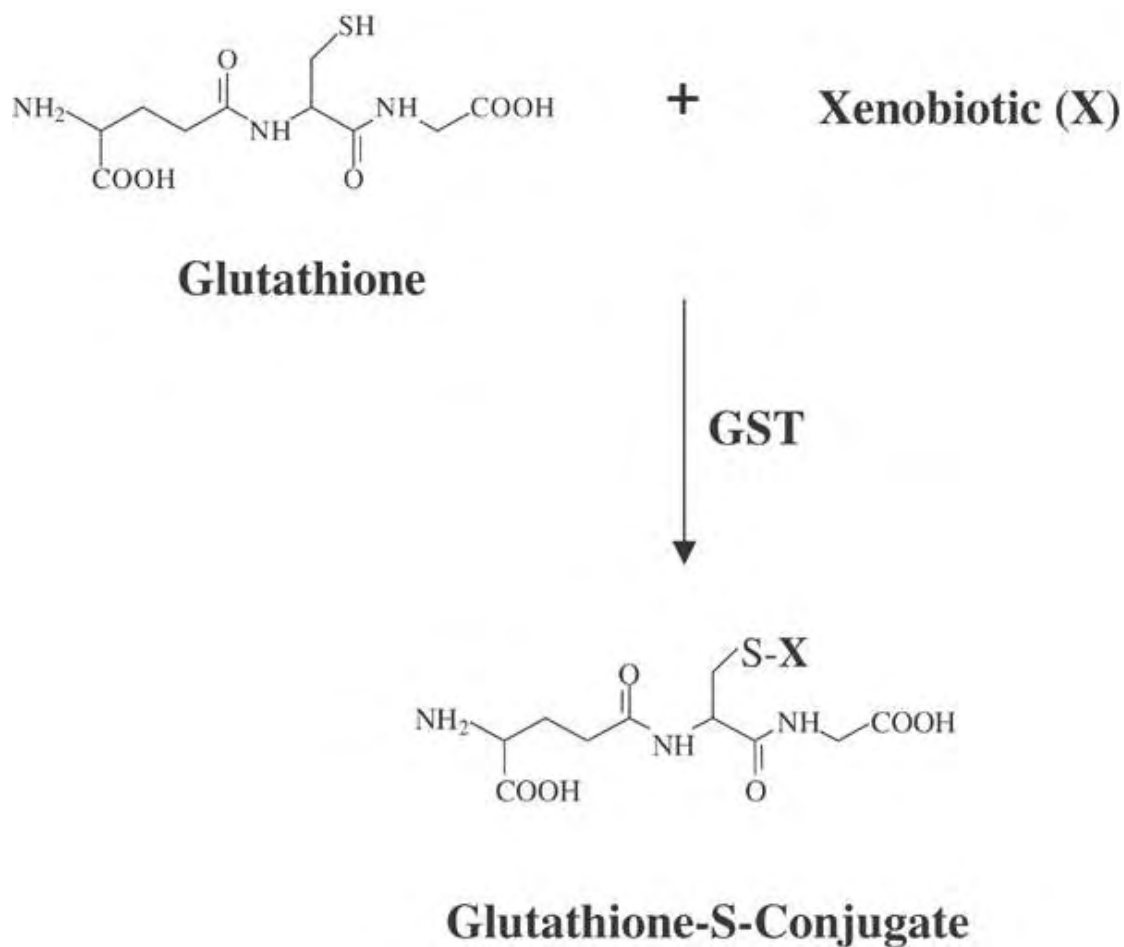
που αποτελείται από δύο υπομονάδες, μια καταλυτική τη GCLC (72-kDa) και μια ρυθμιστική τη GCLM (30-kDa) (Huang et al., 1993) και είναι το υπεύθυνο ένζυμο περιορισμού του ρυθμού της de novo σύνθεσης της γλουταθειόνης (GSH). Η ρυθμιστική υπομονάδα διαμορφώνει τη δραστηριότητα του ενζύμου επηρεάζοντας τη συγγένεια της καταλυτικής υπομονάδας για τα υποστρώματα και τους αναστολείς της (Huang et al., 1993; Tu and Anders 1998). Πάντως στις περισσότερες περιπτώσεις, η αύξηση της γλουταθειόνης GSH οφείλεται κυρίως στην αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου GCL (Dickinson et al., 2004).



Εικόνα 13: Λιγάση γλουταμικής κυστεΐνης (GCL) και Συνθετάση της γλουταθειόνης (GS)

### 2.6.3. Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης GST

Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης GST είναι ένα ένζυμο του μεταβολισμού της φάσης II και έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με ξενοβιοτικά υποστρώματα. Οι αντιδράσεις της γλουταθειόνης με τα ξενοβιοτικά που καταλύονται από τη τρανσφεράση της γλουταθειόνης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Τις αντιδράσεις αντικατάστασης όπου η GSH αντικαθιστά μια χημική ομάδα και συνδέεται με άτομο άνθρακα ή με ετεροάτομο (O, N, S) και τις αντιδράσεις προσθήκης στις οποίες η γλουταθειόνη προστίθεται σε έναν διπλό δεσμό ατόμων άνθρακα ή σε έναν κυκλικό δακτύλιο.



Εικόνα 14: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης

Γενικά η ενεργοποίηση του ARE ή του ηλεκτρόφιλου στοιχείου απόκρισης (ErRE), από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 αποτελεί ένα σημαντικό μέρος των μοριακών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την προστατευτική λειτουργία της αποτοξικοποίησης του μεταβολισμού και των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά της καρκινογένεσης και του οξειδωτικού στρες. Οι περισσότεροι επαγωγείς αυτού του προστατευτικού μηχανισμού προέρχονται κυρίως μέσω της διατροφής.

## **2.7. Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (*Whey protein*)**

Ο ορός γάλακτος (τυρόγαλο) προέρχεται από το γάλα, είναι παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής τυριού και στο παρελθόν θεωρήθηκε λανθασμένα ρύπος. Παρά όλα, με την κατάλληλη επεξεργασία και την απομόνωση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρουσιάζει πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία όπως η αντιοξειδωτική του δράση αλλά και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Με την πρόοδο της τεχνολογίας κατά την επεξεργασία του ορού γάλακτος όπως η υπερδιήθηση, η μικροδιήθηση, η αντίστροφη όσμωση και η ανταλλαγή ιόντων, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών διαφορετικών τελικών προϊόντων. Έτσι έχουμε πρωτεΐνη τυρογάλακτος συμπυκνωμένη (με πρωτεΐνη που κυμαίνεται μεταξύ 80-95%), πρωτεΐνη με μειωμένη λακτόζη, απομονωμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος και αφαλατωμένη πρωτεΐνη που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Κάθε τελικό προϊόν τυρογάλακτος ποικίλλει στο ποσό των πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ανοσοσφαιρινών, λακτόζης, ανόργανων αλάτων και λίπους που περιλαμβάνει.

### **2.7.1. Παρασκευή πρωτεΐνης τυρογάλακτος**

Γενικά το πλήρες γάλα έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, το 20% των οποίων είναι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος. Όταν αφαιρεθούν οι καζεΐνες από το πλήρες γάλα, παραμένει η πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε υγρή μορφή.

Κατά τη διαδικασία λοιπόν της παρασκευής το γάλα παστεριώνεται σε υψηλή θερμοκρασία για μικρή χρονική περίοδο (72°C,30s) και διατηρείται όλη τη νύχτα στους 40°C. Στη συνέχεια το μίγμα ψύχεται στους 30°C, εμβολιάζεται με καλλιέργεια βακτηρίων με σκοπό την παραγωγή γαλακτικού οξέος ώστε να πέσει το pH και επωάζεται για 30 λεπτά. Προστίθεται το εκχύλισμα πυτιάς και το μίγμα αναδεύεται έως ότου πήξει.

Η πυτιά προέρχεται από τον τέταρτο στόμαχο των νεογέννητων μοσχαριών και η χυμοσίνη, το ενεργό ένζυμο της πυτιάς, βοηθά στο πήξιμο του γάλακτος διαχωρίζοντας το σε πηγμένο γάλα για τυρί και σε ορό γάλακτος. Στα νεογέννητα

μοσχάρια, η χυμοσίνη βοηθά στη χώνεψη και στην απορρόφηση του γάλακτος, ωστόσο, οι ενήλικες αγελάδες δεν παρουσιάζουν το ένζυμο αυτό.

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε υγρή μορφή στραγγίζεται με τη βοήθεια κοσκίνων από ανοξείδωτο ατσάλι. Το πηγμένο γάλα για τυρί που παραμένει κόβεται και θερμαίνεται στους 30°C. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή έπειτα φιλτράρεται στους 45°C και προστίθεται κιτρικό οξύ έτσι ώστε το pH να πέσει στο 3. Το υγρό φιλτράρεται έπειτα στο 1/5 του συνολικού του όγκου με αποτέλεσμα να παράγεται το συμπυκνωμένος ορός γάλακτος με πρωτεΐνη περίπου 80%. Στη συνέχεια μπορεί να μικροδιηθηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να φτάσει το 95%. Η τελική συμπύκνωση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος θερμαίνεται και ξηραίνεται με ψεκασμό για την μετατροπή της σε σκόνη. Με τη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων μπορούν να αφαιρεθούν η λακτόζη και τα λίπη. Πολλοί παραγωγοί υδρολύουν (μέσω θέρμανσης ή χρήσης περιοριστικών ενζύμων) την πρωτεΐνη ορού γάλακτος με σκοπό να παρέχουν περισσότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα στο τελικό προϊόν αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική αξία της πρωτεΐνης καθώς διευκολύνεται η απορρόφηση.

### ***2.7.2. Τα συστατικά της πρωτεΐνης τυρογάλακτος***

#### **Αμινοξέα**

Οι πρωτεΐνες τυρογάλακτος έχουν όλες τα απαραίτητα αμινοξέα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με άλλες πηγές πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης όπως η σόγια, το καλαμπόκι και το σιτάρι (Gill et al., 2000) και είναι εύκολα απορροφήσιμα από τον οργανισμό (Daenzer et al., 2001). Σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεϊνών, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος έχει μια υψηλή συγκέντρωση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) όπως λευκίνη, ισολευκίνη, και βαλίνη και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη των ιστών. Επίσης, είναι πλούσια σε αμινοξέα όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη με τα οποία ενισχύεται η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος .

## Λακτοφερίνη

Η λακτοφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη δέσμησης σιδήρου και αποτελεί ένα μη-ενζυματικό αντιοξειδωτικό. Ως συστατικό της πρωτεΐνης τυρογάλακτος αποτελείται από περίπου 689 αμινοξέα, ενώ η λακτοφερίνη του μητρικού γάλακτος αποτελείται από 691 αμινοξέα (Pierce et al., 1991). Η λακτοφερίνη τυρογάλακτος αποτελείται από μία μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα με δύο θέσεις πρόσδεσης για ιόντα του τρισθενούς σιδήρου.

Σύμφωνα με μελέτες, η λακτοφερίνη έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τα NK κύτταρα και τα ουδετερόφιλα, ενώ επάγει τους αυξητικούς παράγοντες CSF (Colony Stimulating Factors) καθώς και την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων. Επίσης, έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε μικροοργανισμούς που απαιτούν σίδηρο για τον πολλαπλασιασμό τους καθώς δεσμεύει σίδηρο, στερώντας τον από τους μικροοργανισμούς ενώ παράλληλα έχει την ικανότητα να καταστρέφει την λιποπολυσακχαριτική μεμβράνη των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων (Tomita et al., 2002). Επιπλέον, η λακτοφερίνη μειώνει τα επίπεδα TNF και IL-6 μειώνοντας έτσι τη φλεγμονή.

## Ανοσοσφαιρίνες

Η ανοσοσφαιρίνη Γ (Ig) είναι ένα αντίσωμα που περιλαμβάνει πέντε κατηγορίες αντισωμάτων IgA, IgD, IgE, IgG και IgM. Η ανοσοσφαιρίνη IgG αποτελεί περίπου το 75% των αντισωμάτων ενός ενήλικα και μεταφέρεται από τη μητέρα στο παιδί μέσω του πλακούντα και αποτελεί τη πρώτη γραμμή ανοσολογικής άμυνας ενός νεογνού. Η ανοσοσφαιρίνη IgA εκκρίνεται στο μητρικό γάλα και μεταφέρεται στο νεογέννητο βρέφος, παρέχοντας καλύτερη ανοσία σε σχέση με τα νεογνά που δεν τρέφονται με μητρικό γάλα (Bonang et al., 2000).

Ομοίως, η πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφανίζει μία σημαντική ποσότητα ανοσοσφαιρινών, περίπου 10-15% των συνολικών πρωτεϊνών. Μελέτες δείχνουν ότι οι ανοσοσφαιρίνες αυτές μπορούν να προσδώσουν ανοσία στον άνθρωπο απέναντι σε ροταϊούς (Kulczycki et al., 1985) καθώς και σε βακτήρια όπως E. coli, Salmonella enteritidis, S. typhimurium, και Shigella flexneri (Losso et al., 1993).

## **Β-Λακτοσφαιρίνη**

Η β-λακτοσφαιρίνης αποτελεί τη κύρια πρωτεΐνη του τυρογάλακτος, ενώ απουσιάζει από τα συστατικά του μητρικού γάλακτος. Εκτός του ότι είναι πηγή των απαραίτητων αμινοξέων και των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα, περιλαμβάνει μια δομική περιοχή που μεταφέρει ρετινοειδή, έχοντας έτσι την ικανότητα να ρυθμίζει τη δράση λεμφοκυττάρων (Guimont et al., 1997).

## **Α-Λακταλβουμίνη**

Η α-λακταλβουμίνη είναι μία σημαντική πρωτεΐνη αφού περιλαμβάνει περίπου το 20-25 τοις εκατό της πρωτεΐνης τυρογάλακτος και αποτελείται από ποικιλία αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων άμεσα διαθέσιμων αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα.

Μέσα από μελέτες αποδείχθηκε ότι η α-λακταλβουμίνη έχει άμεση επίδραση στη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων αφού έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη δράση τους ( Bounous et al., 1985).

## **Λακτοϋπεροξειδάση**

Ο ορός γάλακτος περιέχει πολλών ειδών ένζυμα όπως οι υδρολάσες, οι τρανσφεράσες, οι πρωτεάσες και οι λιπάσες. Η λακτοϋπεροξειδάση, είναι ένα ένζυμο που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στη πρωτεΐνη τυρογάλακτος (περίπου 0,25-0,5 τοις εκατό). Έχει την ικανότητα να καταλύει διάφορες αντιδράσεις όπως την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Bjorck, 1978). Επίσης καταλύει την υπεροξειδωση του θειοκυανικού και ορισμένα αλογόνα (όπως το ιώδιο και βρόμιο). Παράγονται έτσι προϊόντα που αναστέλλουν ή και τερματίζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη (Kussendrager et al., 2000). Τέλος, κατά τη διάρκεια της παστερίωσης η λακτοϋπεροξειδάση δεν απενεργοποιείται, γεγονός που αποδεικνύει τη σταθερότητά της ως συντηρητικό.

## Γλυκομακροπεπίδια

Τα γλυκομακροπεπίδια (GMP) είναι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν το 10-15 τοις εκατό των συστατικών του τυρόγαλου. Προκύπτουν από την επεξεργασία της καζεΐνης με χυμοσίνη και παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και έλλειψη σε αρωματικά αμινοξέα συμπεριλαμβανομένων της φαινυλαλανίνης, της τρυπτοφάνης και της τυροσίνης. Έτσι η έλλειψη αυτή της φαινυλαλανίνης τα καθιστά ιδανικά για τη διατροφή ατόμων που πάσχουν από φαινυλκαϊτονουρία.

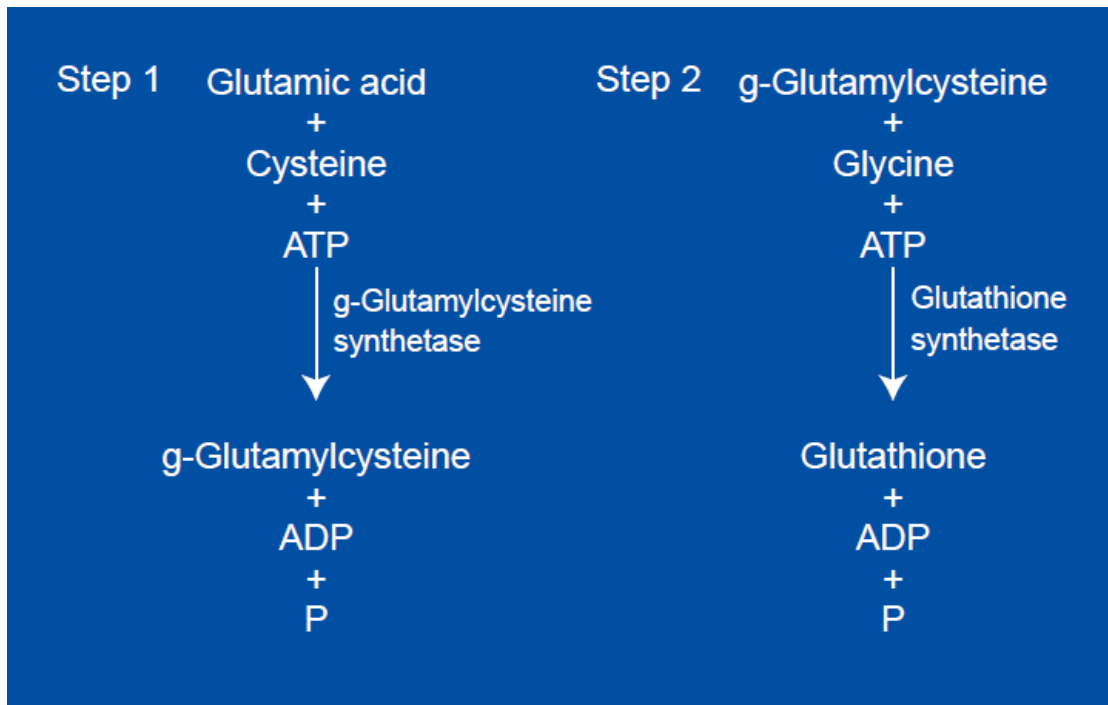
## BSA

Η BSA (ορός αλβουμίνης βοδινού) είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη που εμφανίζεται στη πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε συγκέντρωση 10-15 τοις εκατό και αποτελεί πηγή απαραίτητων αμινοξέων.

### **2.7.3. Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος**

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και οφείλεται κυρίως στη μεγάλη περιεκτικότητά της σε κυστεΐνη η οποία χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για την παραγωγή γλουταθειόνης GSH, ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό (Walzem et al., 2002). Η GSH αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμικό και κυστεΐνη (Εικόνα 15). Η κυστεΐνη περιέχει μια ομάδαθειόλης η οποία δρα ως αναγωγικός παράγοντας στην πρόληψη της οξειδωσης και της βλάβης των ιστών. Η GSH έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στην ανηγμένη της μορφή και σημαντικοί συμπαράγοντές της για την αναγωγή της είναι η ριβοφλαβίνη, η νιασιναμίδα και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Marz, 2002).





Εικόνα 15: Βιοσύνθεση γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ( $GP_x$ ), η οποία προέρχεται από το σελήνιο και την κυστεΐνη, είναι ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο με την ικανότητα να μετατρέπει τα λιπιδικά υπεροξείδια σε λιγότερο δραστικά υδροξύ οξέα. Τα υπεροξείδια αντιδρούν με το  $H_2O_2$  για να το ανάγουν σε νερό, αναιρώντας το οξειδωτικό του δυναμικό. Τα προϊόντα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται ως πηγή κυστεΐνης για την αύξηση της ενδοκυτταρικών επιπέδων γλουταθειόνης (Crinnion, 2000) και έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητας της  $GSHP_x$  στο αγελαδινό γάλα και πιθανώς στον ορό γάλακτος είναι η ίδια όπως στο ανθρώπινο γάλα (Hojo, 1986).

### **3. Σκοπός πειράματος**

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης τυρογάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nuclear factor (erythroid-derived 2) (Nrf2) και ενός αριθμού επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT, GCS καθώς και η ενζυμική δράση κάποιων επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT, SOD και GST σε μυικά κύτταρα C2C12 και ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

### **4. Υλικά και Μέθοδοι**

#### **4.1. Υλικά**

##### **4.1.1. Αντιδραστήρια**

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (Grand Island, NY).

##### **4.1.2.α. Κυτταρική σειρά EA.hy926**

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 μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Ακόμη, διαθέτει ένα μοναδικό δείκτη χρωμοσωμάτων που

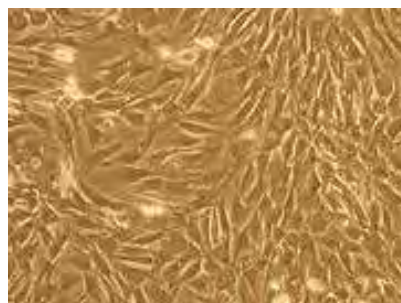
βοηθά στην εύκολη ταυτοποίηση τους. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν αυτή την κυτταρική σειρά ως πρότυπο για τη μελέτη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου [Edgell et al., 1983].



Εικόνα 16: Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926

#### **4.1.2.β. Μυϊκά κύτταρα C2C12**

Τα μυϊκά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ επιμύων μετά από μηχανικό τραυματισμό. Είναι ικανά να διαφοροποιούνται και αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe και Saxel, 1977).



Εικόνα 17: Κυτταρική σειρά μυϊκών κυττάρων C2C12

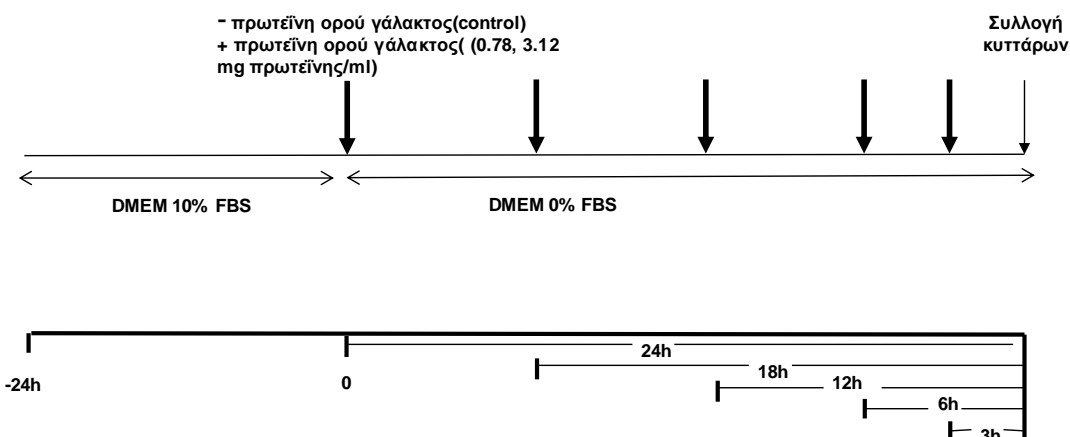
### **4.1.3. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926**

Οι κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy926 καλλιεργούνταν σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι πλήρης από κύτταρα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

### **4.1.4. Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Nrf2*, των αντιοξειδωτικών ενζύμων *SOD-1*, *HO-1*, *CAT* *GCS* και της ενζυμικής δράσης της *CAT*, *SOD* και *GST***

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 27. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργούνταν σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται, αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS και προστίθεται η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 mg πρωτεΐνης/ml και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) (1 ml) και ακολουθεί επώαση για διάφορες χρονικές στιγμές (24h, 18h, 12h, 6h, 3h). Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Μετά την προσθήκη πρωτεΐνης ακολουθεί επώαση για 24 h. Μετά το τέλος της επώασης, ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (1ml) (0.25%), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:1 (0,01

Μ με pH 7,4) και φυγοκέντρωση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται στο κατάλληλο ρυθμιστικό λυτικό διάλυμα (lysis buffer).



**Εικόνα 18:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2, της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1), της καταλάσης (CAT), της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) και της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) και της ενζυμικής δράσης της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης(GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. 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 αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml). Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

#### 4.1.5. Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος

Τα κύτταρα λύνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ραδιοανοσοκαθίζησης [radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA buffer] (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.25% SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 1mM EDTA), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete<sup>TM</sup> mini protease inhibitors), και επωάζονται για 30 min στον πάγο με ταυτόχρονη ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 16.250 g, στους 4°C για 20 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται, ακολουθεί προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

#### ***4.1.6. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρόλυματος***

Τα κύτταρα λύνονται με 50-150  $\mu$ l κυτοσολικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (cytosolic lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete<sup>TM</sup> mini protease inhibitors). Στη συνέχεια επώάζονται στον πάγο για 20 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο (κυτοσολικό κυτταρόλυμα) απομακρύνεται και το ίζημα λύεται ξανά με 50-100  $\mu$ l πυρηνικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (nuclear lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% γλυκερόλη, 420 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete<sup>TM</sup> mini protease inhibitors). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με υπερήχους για 30 sec σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 15 min και το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το πυρηνικό κυτταρόλυμα. Στο κυτοσολικό και πυρηνικό κυτταρόλυμα έγινε προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

#### ***4.1.7. 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{L}$  προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

#### ***4.1.8. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρολύματος***

Τα κύτταρα λύνονται με 50-150  $\mu\text{l}$  κυτοσολικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (cytosolic lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete<sup>TM</sup> mini protease inhibitors). Στη συνέχεια επωάζονται στον πάγο για 20 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο (κυτοσολικό κυτταρόλυμα) απομακρύνεται και το ίζημα λύεται ξανά με 50-100  $\mu\text{l}$  πυρηνικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (nuclear lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% γλυκερόλη, 420 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete<sup>TM</sup> mini protease inhibitors). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με υπερήχους για 30 sec σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 15 min και το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το πυρηνικό κυτταρόλυμα. Στο κυτοσολικό και πυρηνικό κυτταρόλυμα έγινε

προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυση.

#### **4.1.9. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Nrf2* και των ενζύμων *SOD-1*, *HO-1*, *CAT* και *GCS* με τη μέθοδο *Western blot***

Η τεχνική *Western blotting* (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών βασιζόμενη στην ικανότητα τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Towbin et al. (1979) και έκτοτε έχει γίνει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους της έρευνας. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική οι επιστήμονες μπορούν να προσδιορίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες από ένα μίγμα πρωτεϊνών που εξάγεται από κύτταρα. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τρεις συνιστώσες για να ολοκληρωθεί: 1) διαχωρισμός βάσει μεγέθους, 2) μεταφορά σε στερεό υπόστρωμα και 3) σήμανση της πρωτεΐνης με το κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

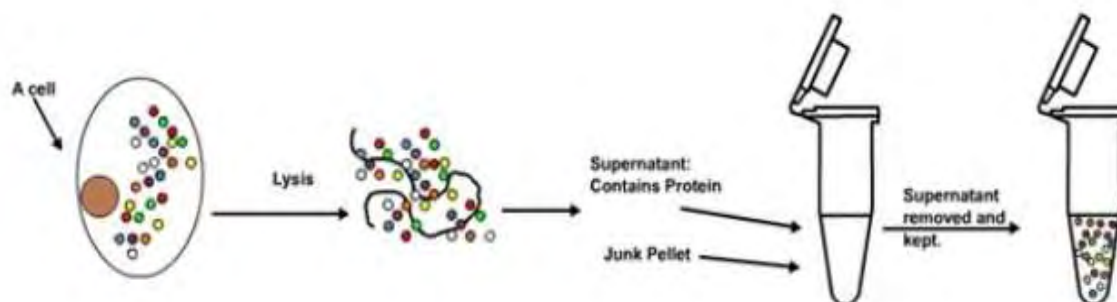
Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης το μίγμα της πρωτεΐνης εφαρμόζεται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης (*SDS-PAGE*, *native PAGE*, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων) για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το φορτίο ή άλλες διαφορές στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Οι διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, *PVDF*). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται στύπωση. Οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στη μεμβράνη με το ίδιο μοτίβο όπως είχαν διαχωριστεί. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες είναι προσβάσιμες στην πρόσδεση αντισωμάτων για ανίχνευση.

Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

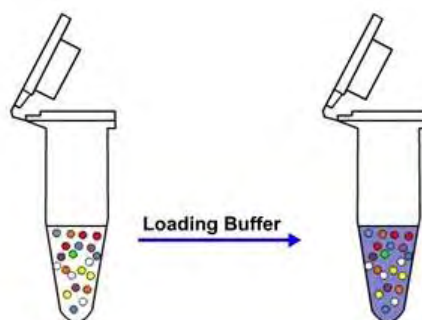


## Βήμα 1: Προετοιμασία δείγματος

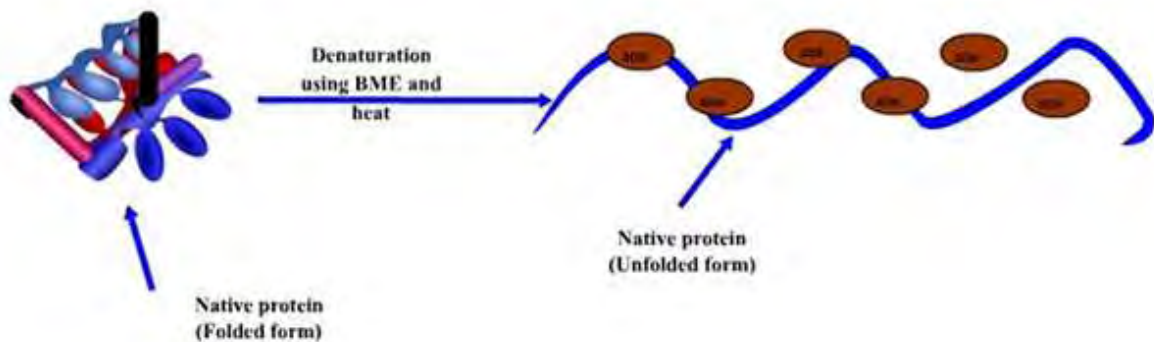
Το πρώτο βήμα στην προετοιμασία δείγματος είναι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το δείγμα. Συνήθως οι πρωτεΐνες προέρχονται από κύτταρα.



Στη συνέχεια προσδιορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος. Έπειτα στο δείγμα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως Laemmli buffer) που περιέχει SDS, γλυκερόλη και β-μερκαπτοαιθανόλη (BME).

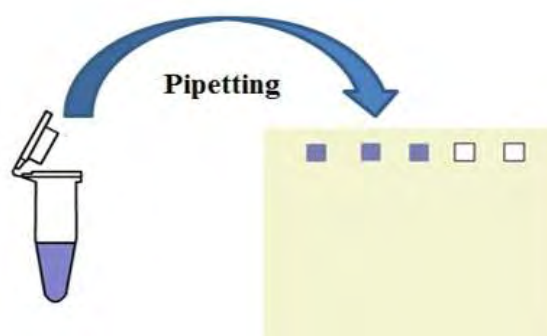


Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται και θερμαίνονται κοντά στο σημείο βρασμού, το οποίο μετουσιώνει την πρωτεΐνη και επιτρέπει την πρόσδεση του SDS στην πρωτεΐνη.



## Βήμα 2: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

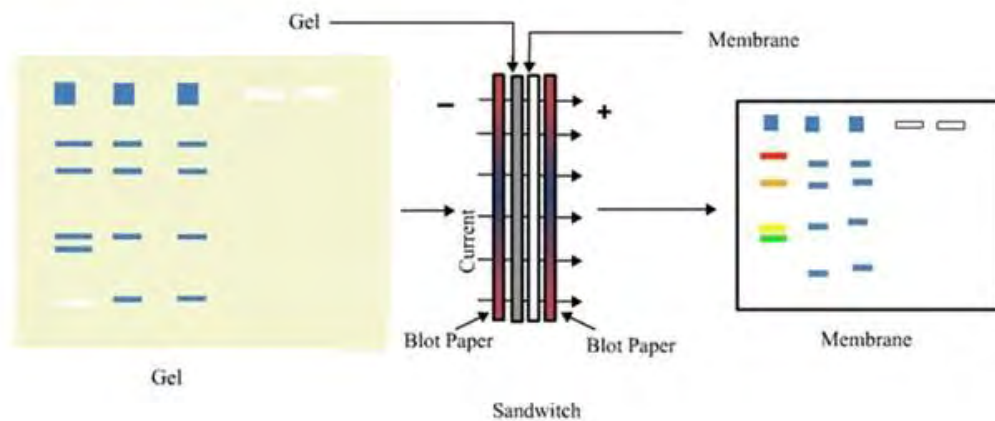
Το πρώτο βήμα είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια στην κορυφή του τζελ. Ένας δείκτης μοριακού βάρους συνήθως φορτώνεται σε ένα από τα πηγαδάκια, το οποίο καθορίζει το μοριακό βάρος των άλλων πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Το πρωτεϊνικό μέγεθος μεράται σε kilodaltons (kDa). Η γλυκερόλη που περιέχεται στα δείγματα τα βοηθάει να βυθίζονται στα πηγαδάκια και το μπλε χρώμα επιτρέπει την οπτικοποίηση των δειγμάτων καθώς το τζελ τρέχει.

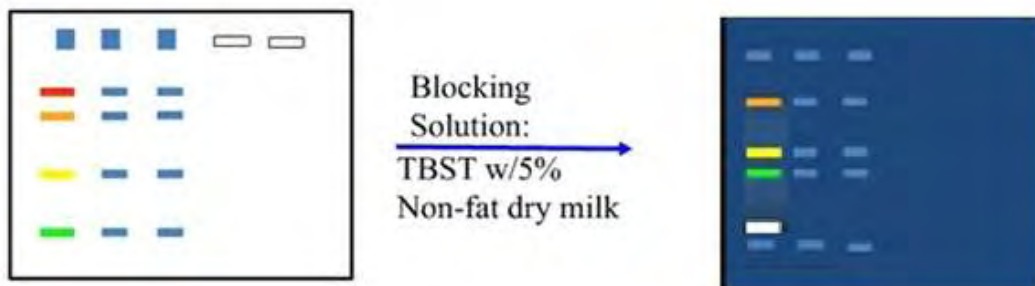


Μόλις φορτωθεί ο δείκτης και τα δείγματα, εφαρμόζεται τάση ρεύματος (~ 150 V) στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Καθώς ο πόλος στην κορυφή της πηκτής είναι αρνητικός και στην άλλη άκρη είναι θετικός, επειδή οι πρωτεΐνες έχουν προσδεθεί με το αρνητικά φορτισμένο SDS μετακινούνται διαμέσου της πηκτής προς τον θετικό πόλο.

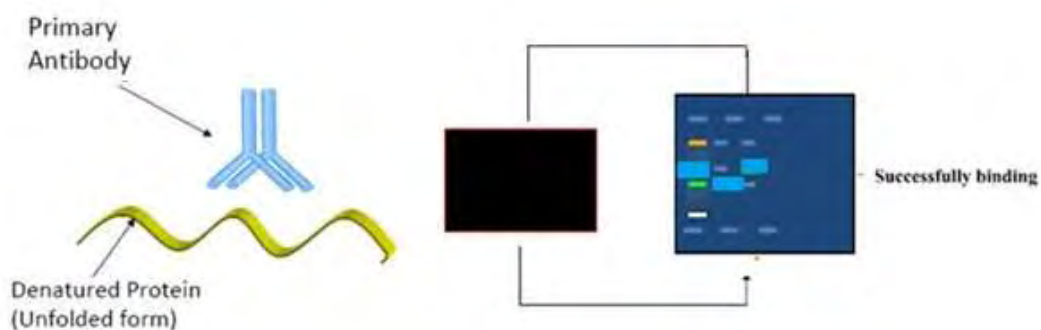
### Βήμα 3: Μεμβρανική μεταφορά

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται απέναντι σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Στη συνέχεια ρεύμα διέρχεται διαμέσου του πηκτώματος προς την μεμβράνη με σκοπό τη μεταφορά των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη.





Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στο διάλυμα που βρίσκεται η μεμβράνη, το οποίο αναγνωρίζει μια ειδική αμινοξική αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.



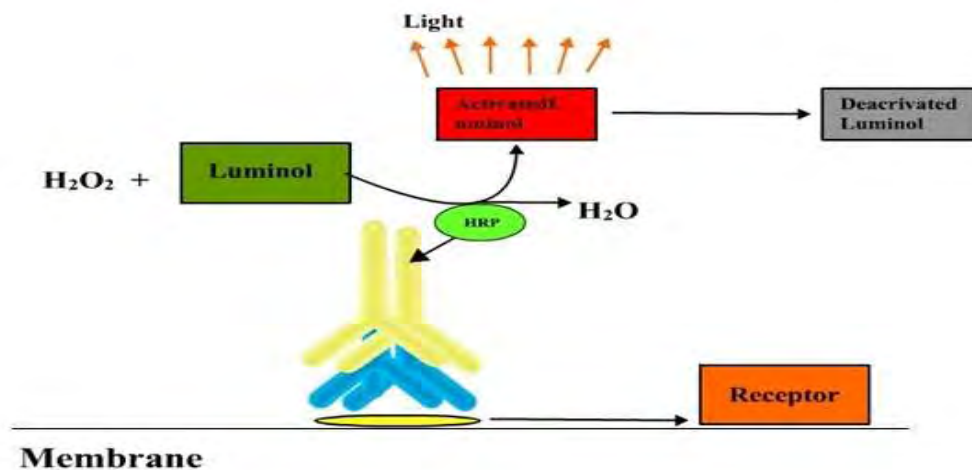
Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο πρωτογενές αντίσωμα και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτογενές και συνήθως είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP.



Τέλος, πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος. Μη-ειδική δέσμευση των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων μπορεί να συμβεί αλλά οι πλύσεις ελαχιστοποιούν αυτό το πρόβλημα. Ο χρόνος επώασης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος επηρεάζει άμεσα την ειδικότητα και την ισχύ της δέσμευσης.

### Βήμα 5: Ανίχνευση

Η μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται στο ένζυμο με το οποίο είναι συζευγμένο το δεύτερο αντίσωμα. Το πιο κοινό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Western blotting είναι το HRP και το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι γνωστό ως υπόστρωμα χημειοφωταύγειας.



Όταν το υπόστρωμα προστεθεί, το φως που εκπέμπεται μπορεί να ανιχνευθεί είτε με τη χρήση φιλμ είτε με τη χρήση ενός απεικονιστή εικόνων.



Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων του Nrf2, της SOD-1, της HO-1, της CAT και της GCS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Το ολικό κυτταρόλυμα που περιέχει 50  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της SOD-1, της HO-1 και της CAT, το κυτοσολικό κυτταρόλυμα που περιέχει 30-50  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του κυτοσολικού Nrf2 και της GCS και το πυρηνικό κυτταρόλυμα που περιέχει 30  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του πυρηνικού Nrf2. Στο πρωτεϊνικό κυτταρόλυμα προστίθεται 6 $\times$  Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα “φορτώνονται” και διαχωρίζονται σε 6-10% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή ακρυλαμίδιου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 0.5 M pH 6.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 1.5 M pH 8.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή ακρυλαμίδιου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, τοποθετούμε το πήκτωμα τοποθετείτε μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη

PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4 °C overnight. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επώαστηκε για 1 h με τα πρωτογενή αντισώματα (anti-Nrf2, αραιώση 1:2000; anti-SOD-1, αραιώση 1:600; anti-GCS, αραιώση 1:600; anti-HO-1, αραιώση 1:400; anti-CAT, αραιώση 1:400) σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-rabbit, αραιώση 1:5000; anti-goat, αραιώση 1:3000) για 30 min σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Η πρωτεΐνη GAPDH και η πρωτεΐνη PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά control. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 min της μεμβράνης με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ( ) για 1 min και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Το ποσό του ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ..... Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

#### **4.1.10. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT**

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT στα δείγματα έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984). Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 3 ml στο οποίο περιέχονται 150 μl κυτταροπλασματικού αιωρήματος και 2845 μl 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37°C. Πέντε μl από διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτική απορρόφηση στα 240 nm (UV) για 1.5 min. Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται ως η μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο

γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της CAT με το υπόστρωμα (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit (μmol/min) της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ CAT/ mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/40) \times 20 \times 1000]/C_{\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}$ : Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240}\text{H}_2\text{O}_2$  (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{l}$  αιωρήματος [3000 μl /150 μl]).

Τιμή 1000: Για την μετατροπή mol/l σε μmol/ml.

$C_{\delta}$ : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

#### **4.1.11. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD**

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberly & Spitz (1984).

Πιο αναλυτικά, 800 μl SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8); 1 U καταλάσης;  $5.6 \times 10^{-5}$  M NBT;  $10^{-4}$  M ξανθίνης) αναμιγνύονται με 200 μl 0.05M potassium phosphate buffer. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κυψελίδα και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα στην κυψελίδα προστίθενται ~60 mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3.5 min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control



rate). Στη συνέχεια 200 μl του ολικού κυτταρολύματος προστίθενται σε 800 μl SOD buffer και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα προστίθενται ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3.5 min στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{control rate} - \text{sample rate}) / \text{control rate}] \times 100 / C_{\delta}$$

Control rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του μάρτυρα ανα λεπτό.

Sample rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του δείγματος ανα λεπτό.

C<sub>δ</sub>: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

#### **4.1.12. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST**

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των (Habig et al. 1974).

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 7.4) με 50 μl GSH (1 mM) και 20 μl CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10 μl του κυτοσολικού κυτταρολύματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm για 5 min. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλυμα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ CAT/ mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/0.0096) \times 100]/C_{\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}$ : Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240}\text{CDNB}$  ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 0.0096 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του CDNB.

Τιμή 100: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{l}$  αιωρήματος [1000  $\mu\text{l}$  /10  $\mu\text{l}$ ]).

$C_{\delta}$ : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

## **4.2. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0.05$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

## **5. Αποτελέσματα**

### **5.1. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS με τη μέθοδο Western blot**

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των επαγόμενων από αυτόν ενζύμων, όπως η SOD-1, η HO-1, η CAT και η GCS, χρησιμοποιήθηκε η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στις συγκεντρώσεις των 0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν επηρέασε τα επίπεδα τόσο του κυτοσολικού όσο και του πυρηνικού Nrf2 (Γράφημα 1A,B,C,D). Όσον αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, στη συγκέντρωση των 3.12 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του κυτοσολικού Nrf2 τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 41.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 2A) και αύξηση του πυρηνικού Nrf2 τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h, 12 h και 18 h κατά 170%, 82.5%, 70% και 55% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 2B). Στη συγκέντρωση των 0.78 mg πρωτεΐνης/ml τα επίπεδα του κυτοσολικού Nrf2 δεν επηρεάστηκαν (Γράφημα 2C) ενώ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του πυρηνικού Nrf2 τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h, 18 h και των 24 h κατά 32%, 53%, 57% και 52% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 2D).

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της SOD-1 πραγματοποιήθηκε στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD-1 τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h και 18 h κατά 17%, 18.5% και 32% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 3A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 3B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD-1 τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h, 18 h και 24 h κατά 56%, 57.5%, 44.5% και 44% αντίστοιχα σε σχέση με το control

(Γράφημα 4A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 4B).

Όσον αφορά την HO-1, ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής της έκφρασης πραγματοποιήθηκε στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HO-1 τις χρονικές στιγμές των 3 h και 6 h κατά 19% και 27.5% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 5A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε μείωση της HO-1 στις 24 h κατά 46% σε σχέση με το control (Γράφημα 5B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HO-1 τη χρονική στιγμή των 6 h κατά 23% σε σχέση με το control (Γράφημα 6A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 6B).

Τα επίπεδα έκφρασης της CAT προσδιορίστηκαν επίσης στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 3 h κατά 26.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 7A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε μείωση της CAT στις 24 h κατά 26% σε σχέση με το control (Γράφημα 7B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τις χρονικές στιγμές των 3 h και 6 h κατά 21% και 19% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 8A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 8B).

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της GCS στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα. Βρέθηκε ότι στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GCS τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h και 12 h κατά 20%, 22% και 24% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 9A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 9B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρατηρήθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν υπήρξε καμία επίδραση (Γράφημα 10A,B).

## **5.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT**

Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 29.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 11A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 11B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 84% σε σχέση με το control (Γράφημα 12A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 12B).

## **5.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD**

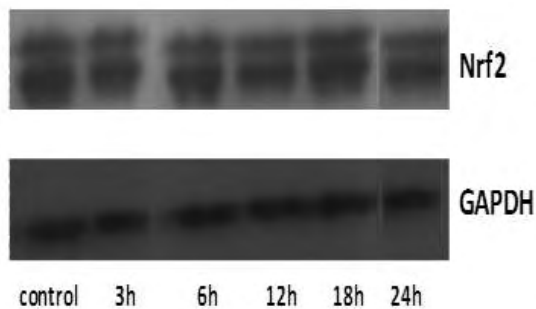
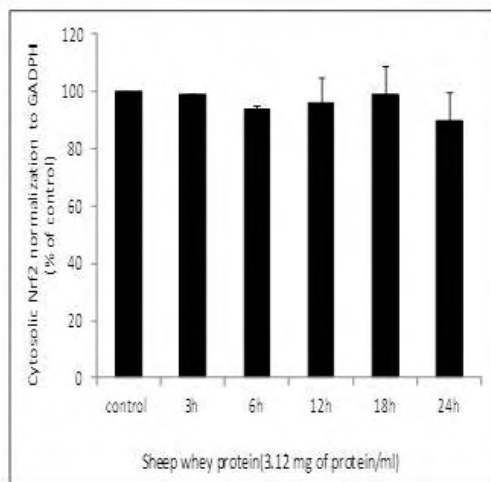
Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h και 12 h κατά 25.5%, 22% και 17.5% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 13A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 13B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h και 18 h κατά 35%, 37.5% και 30% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 14A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 14B).

## **5.4. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST**

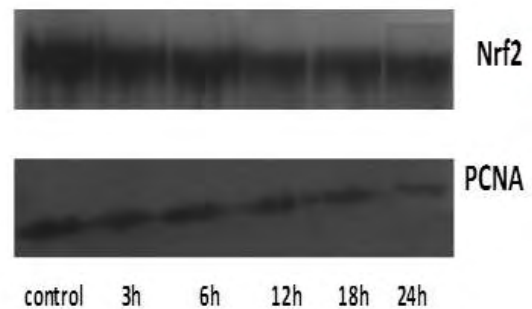
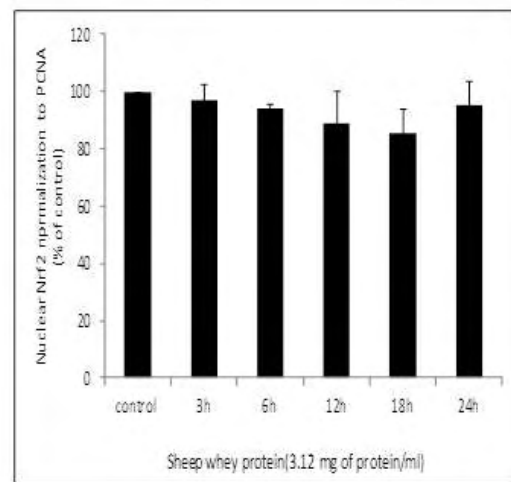
Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GST τη χρονική στιγμή των 6 h κατά 28.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 15A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 15B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η

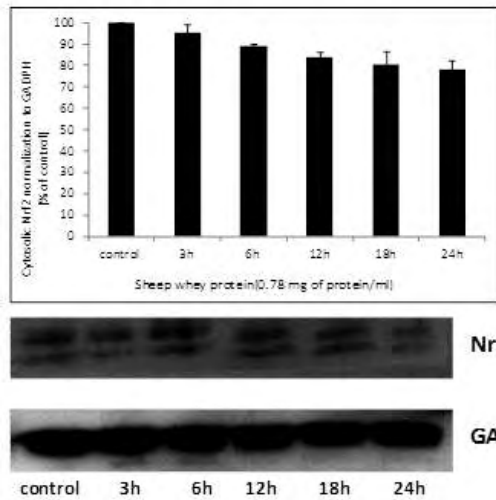
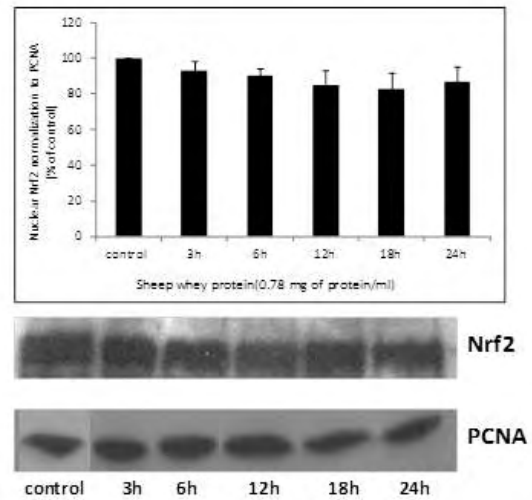
αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GST τις χρονικές στιγμές των 18 h και 24 h κατά 33.5% και 31% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 16A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 16B).

**A**

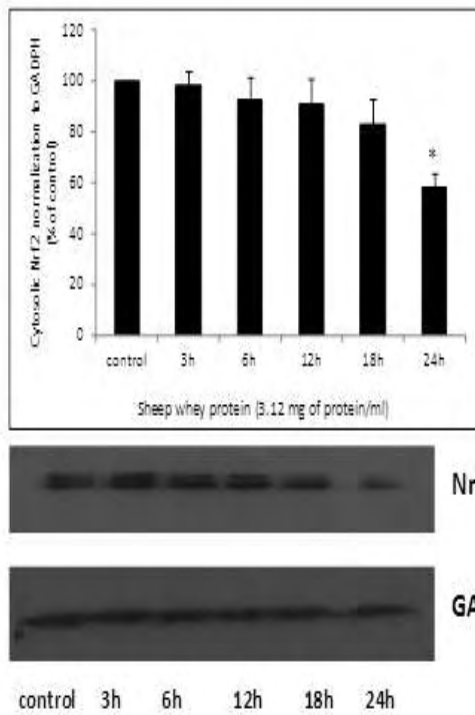
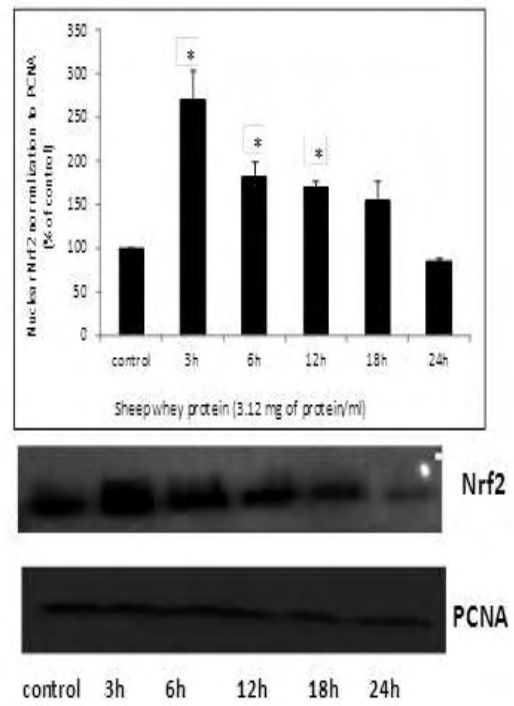
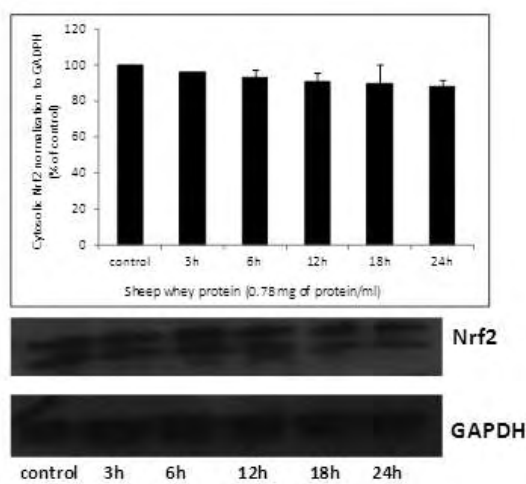
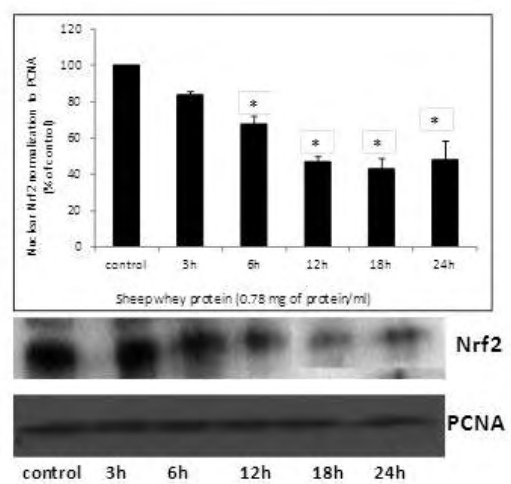


**B**



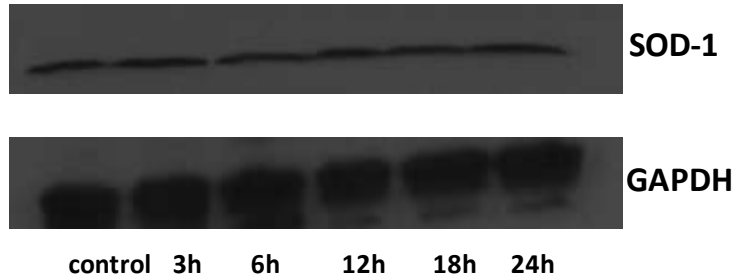
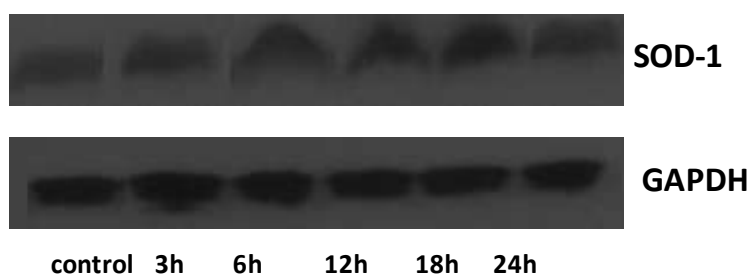
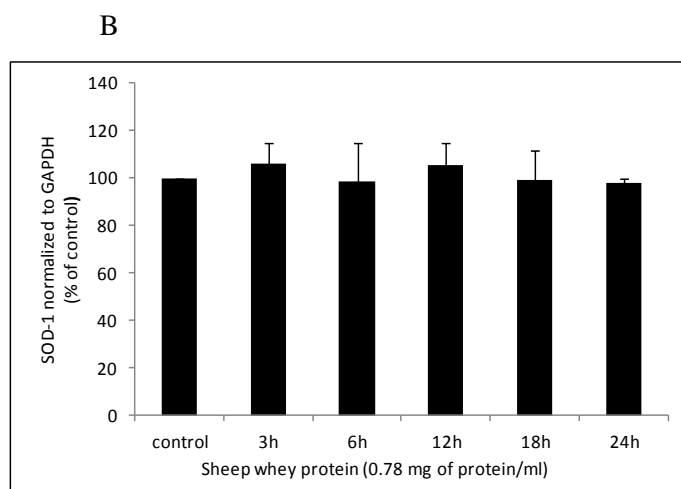
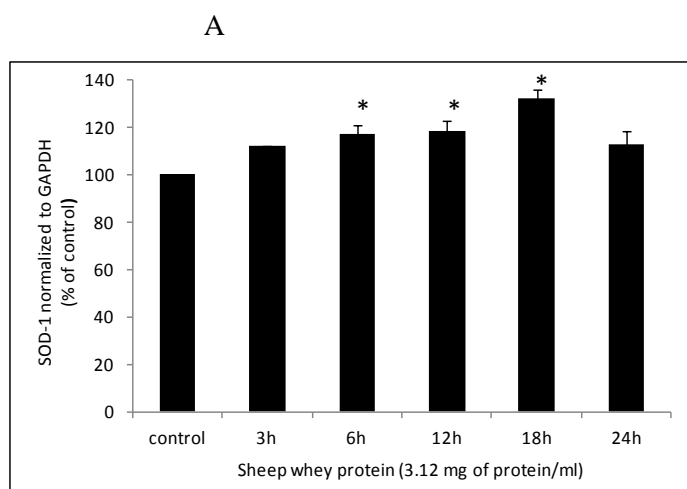
**C****D**

**Γράφημα 1** : Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης του Nrf2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (C) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (D) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH και του PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως control κανονικοποίησης για το κυτοσολικό και το πυρηνικό κυτταρόλυμα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

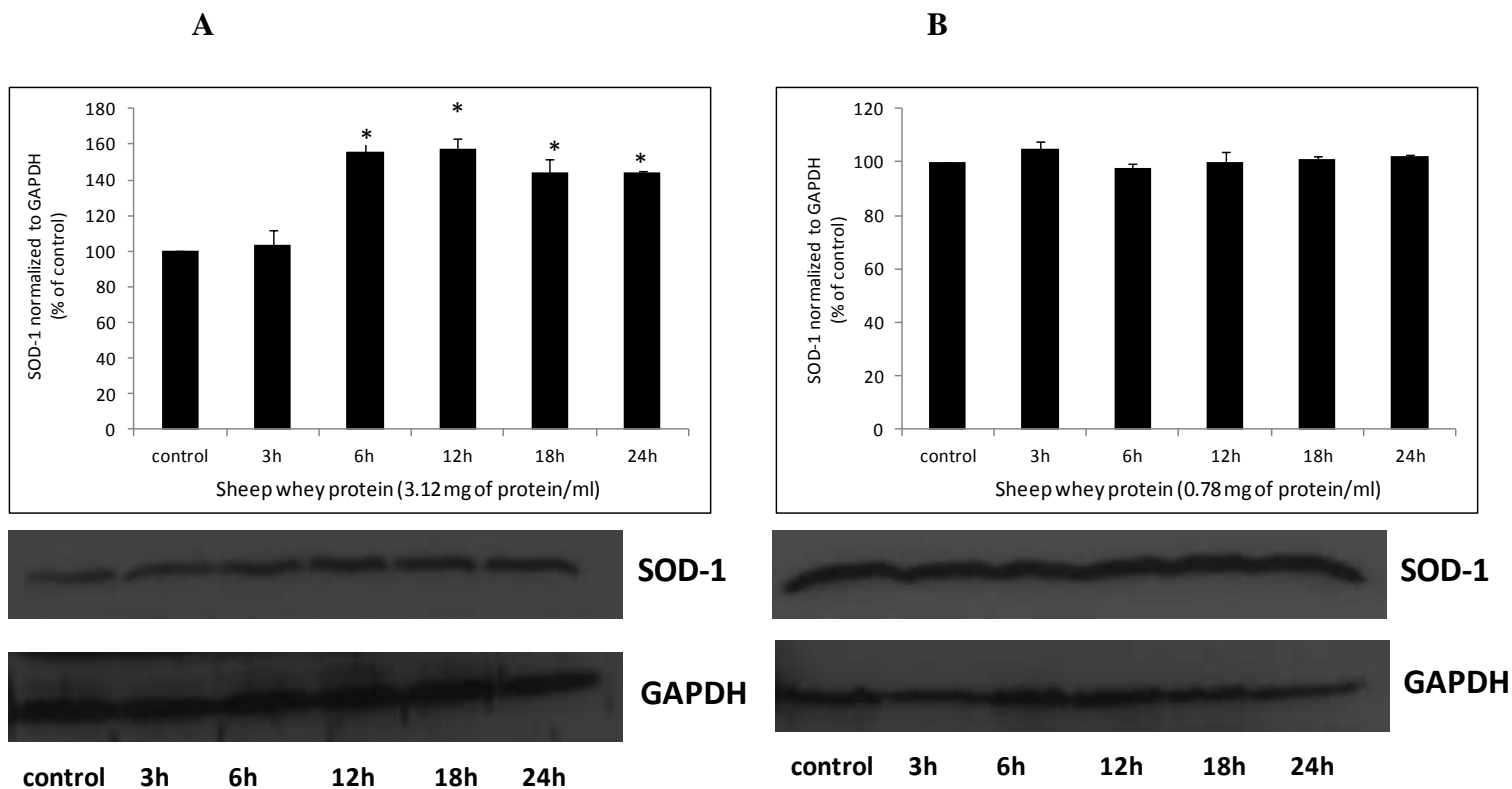
**A****B****C****D**



**Γράφημα 2 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης του Nrf2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot .(A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (C) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (D) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH και του PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως control κανονικοποίησης για το κυτοσολικό και το πυρηνικό κυτταρόλυμα αντίστοιχα. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

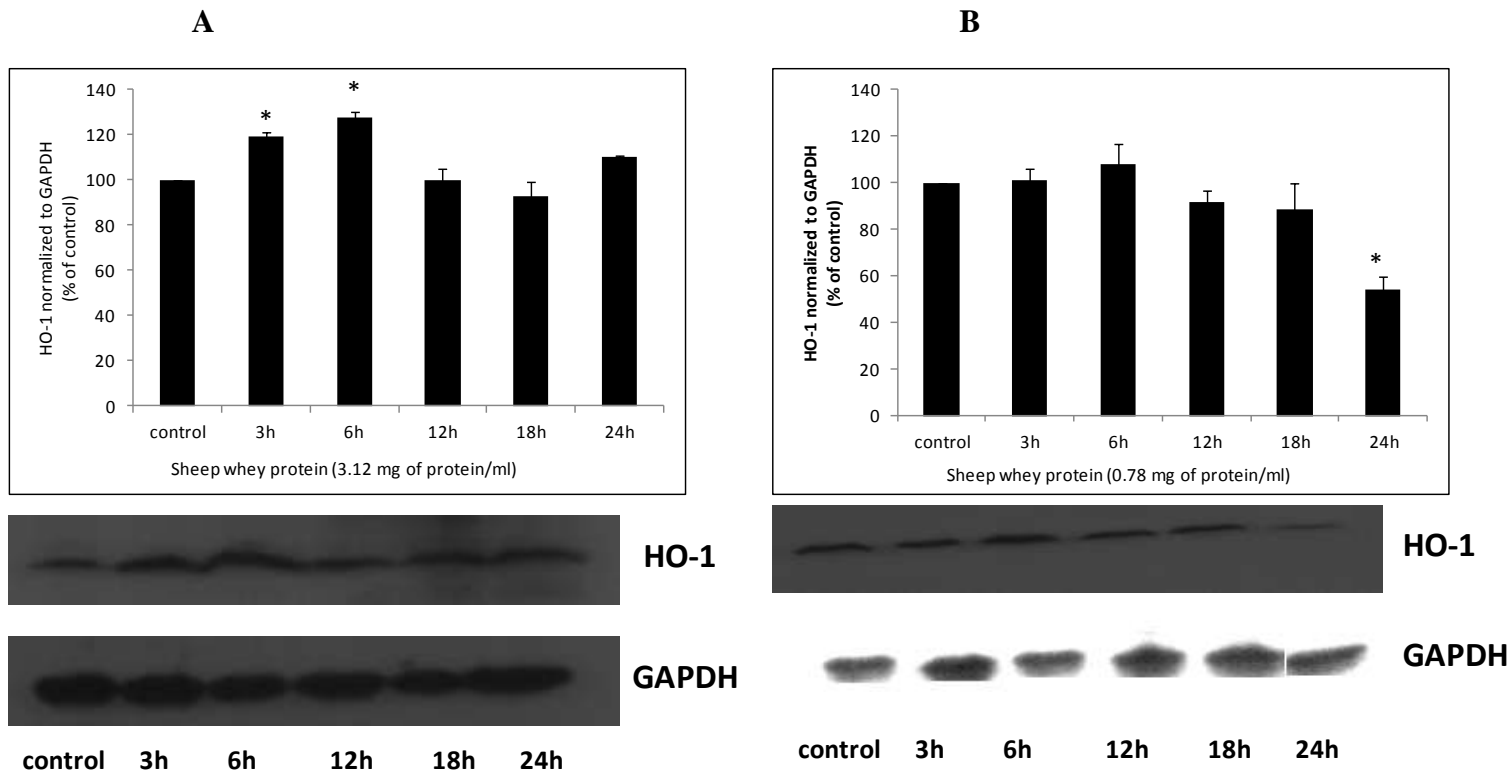


**Γράφημα 3 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της SOD-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

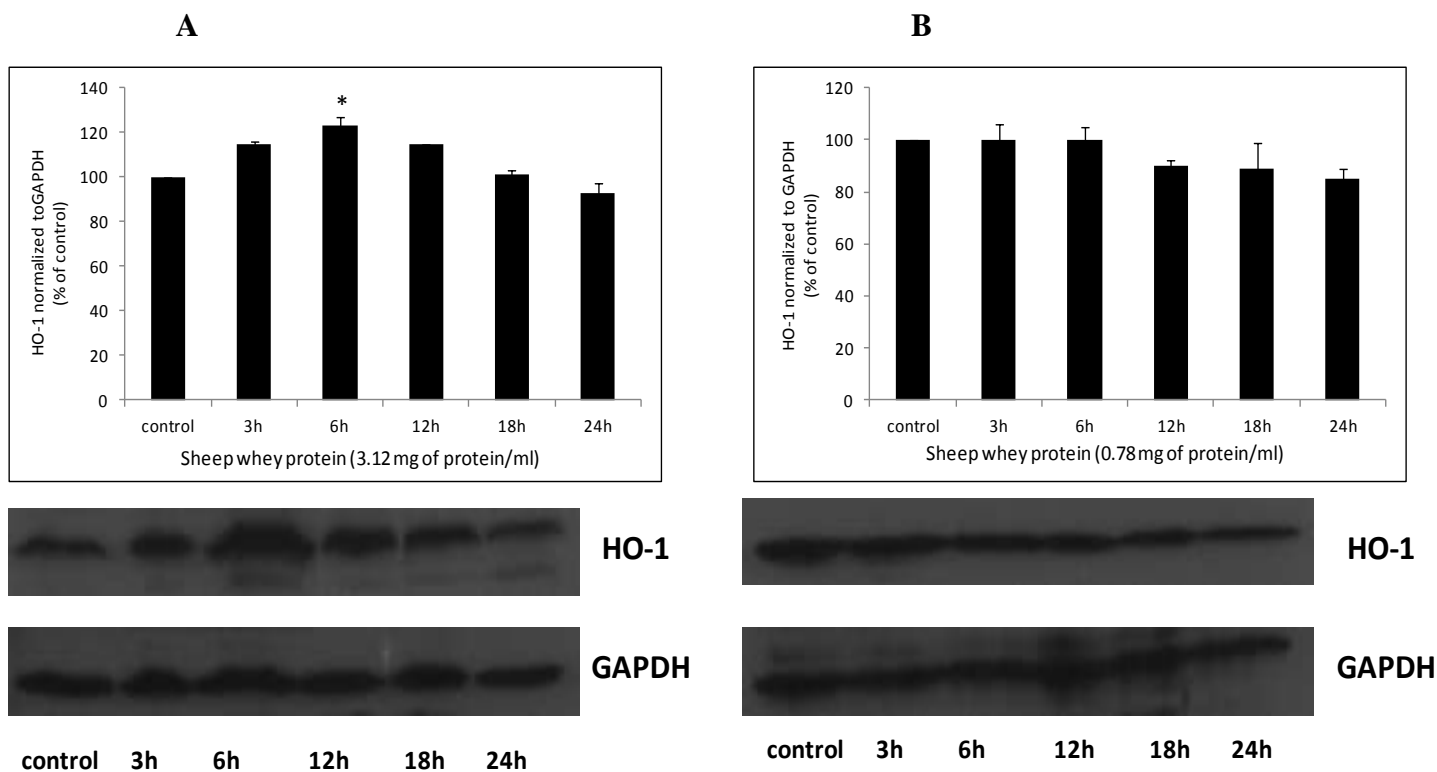


**Γράφημα 4 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της SOD-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων

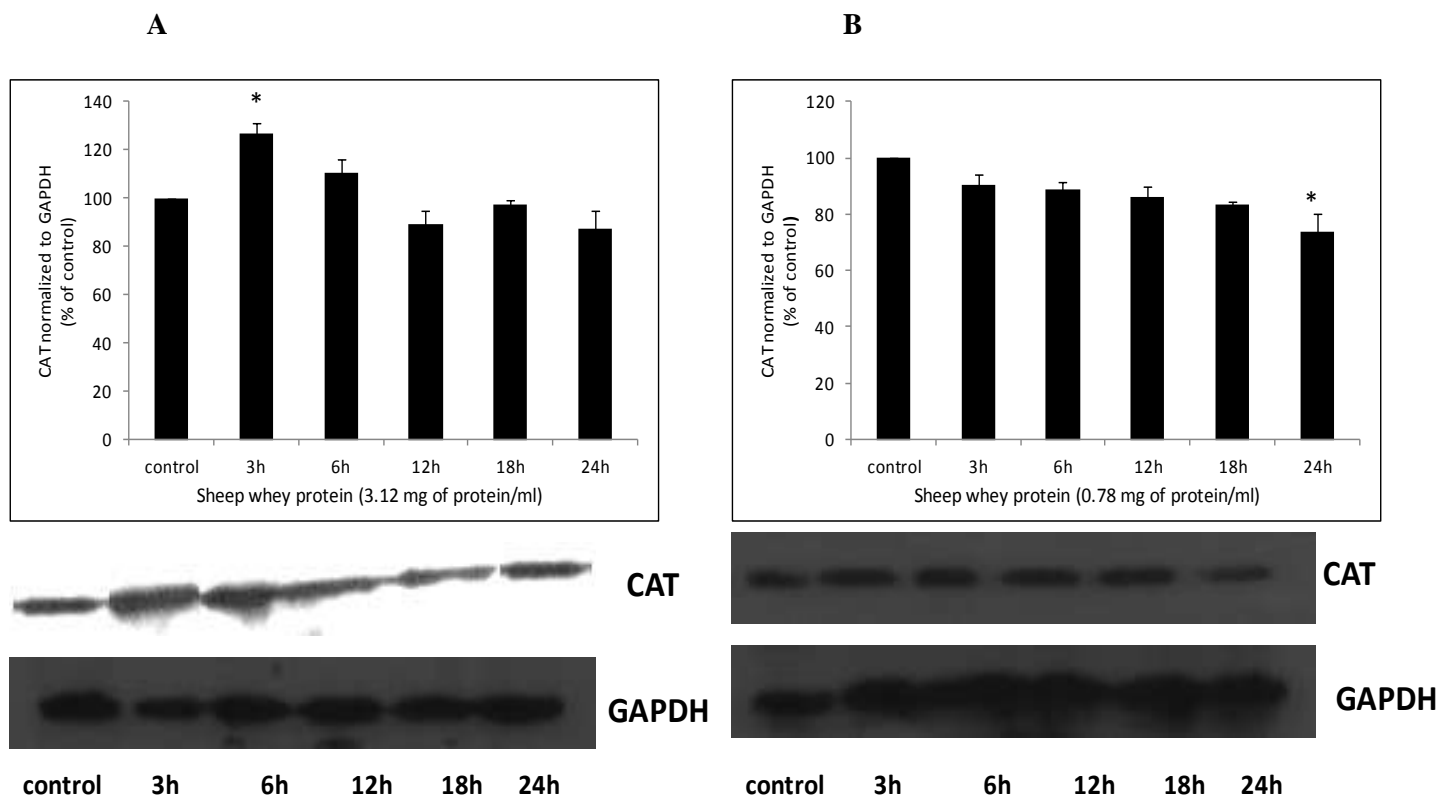
της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



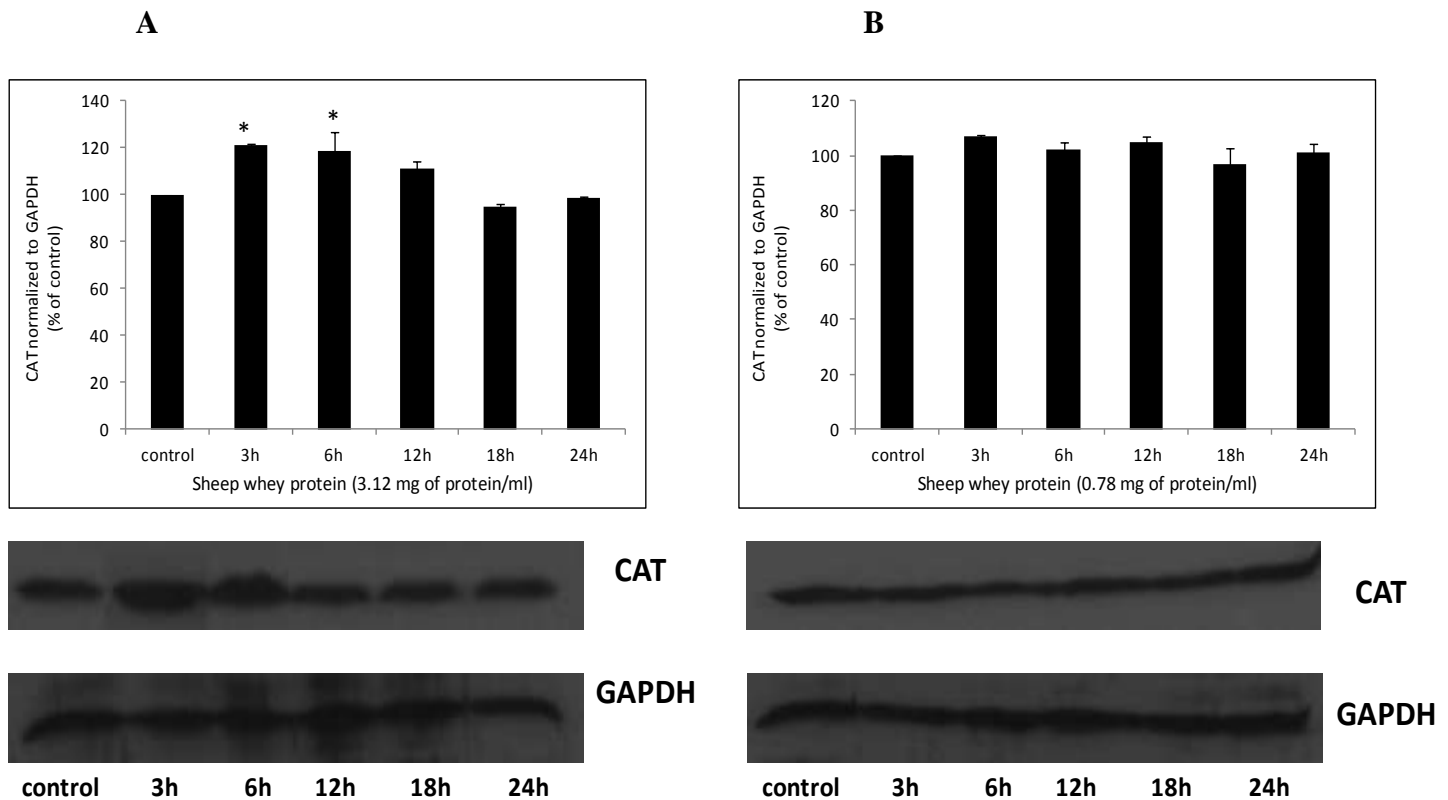
**Γράφημα 5 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της HO-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



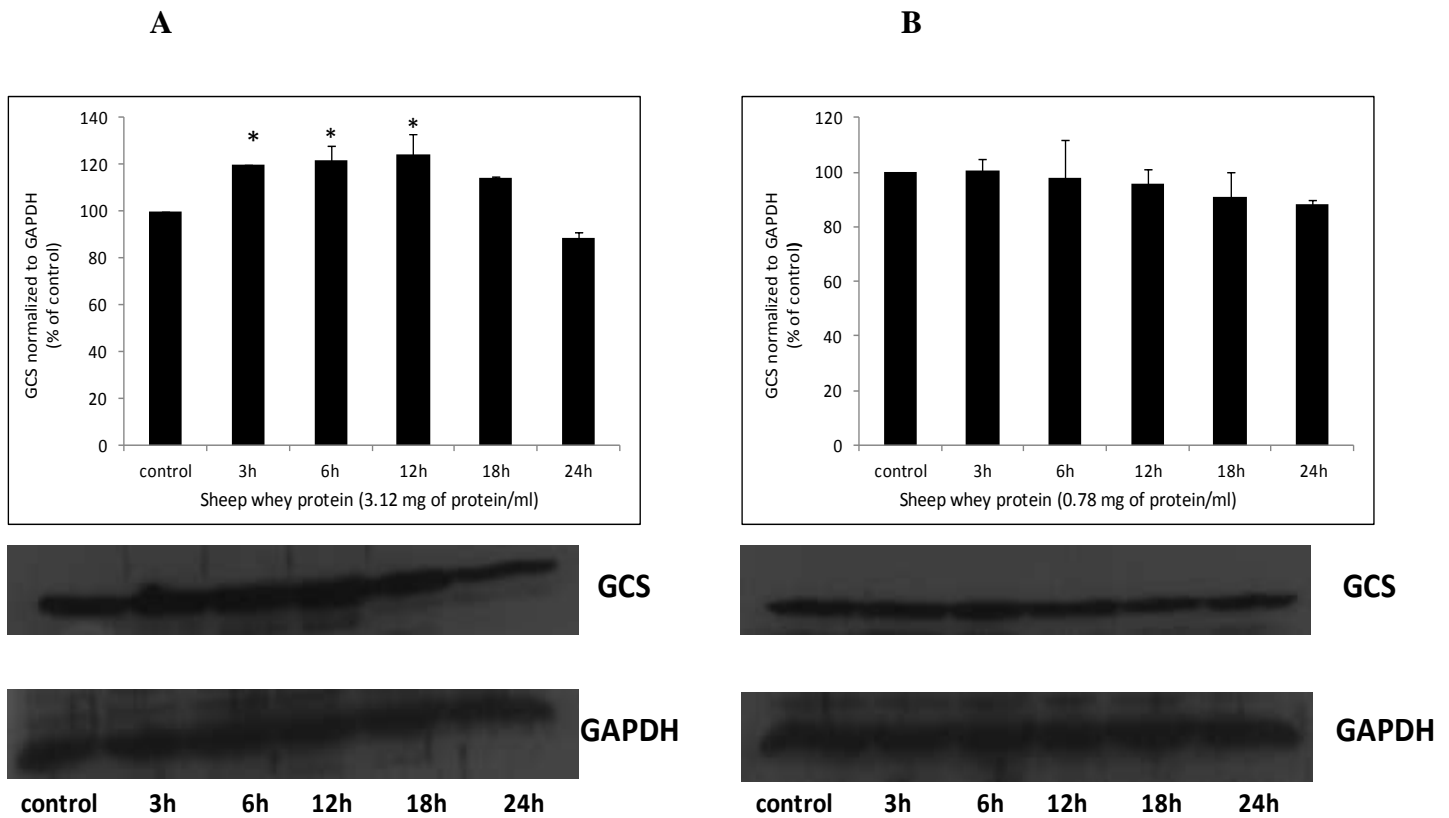
**Γράφημα 6 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της HO-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



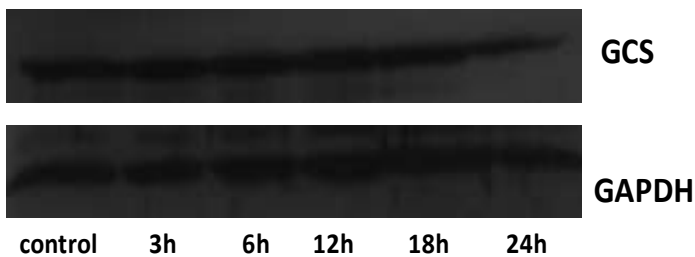
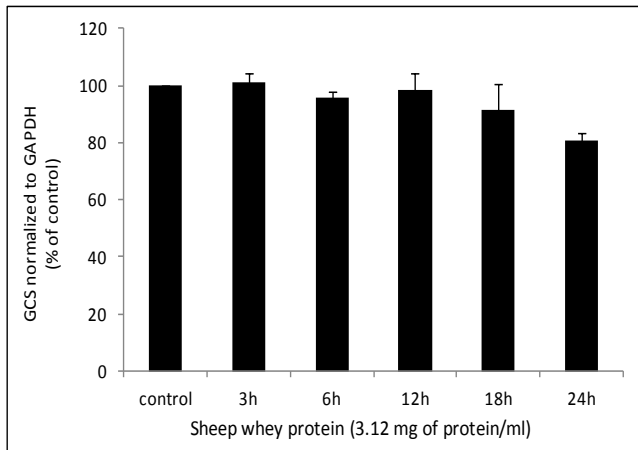
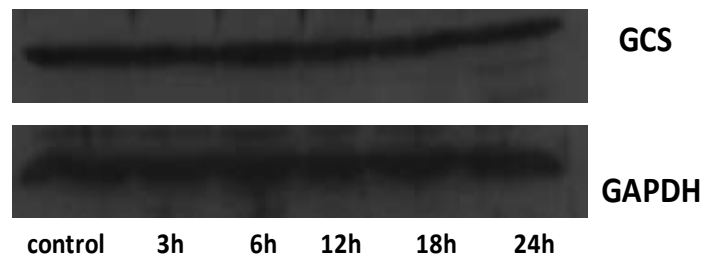
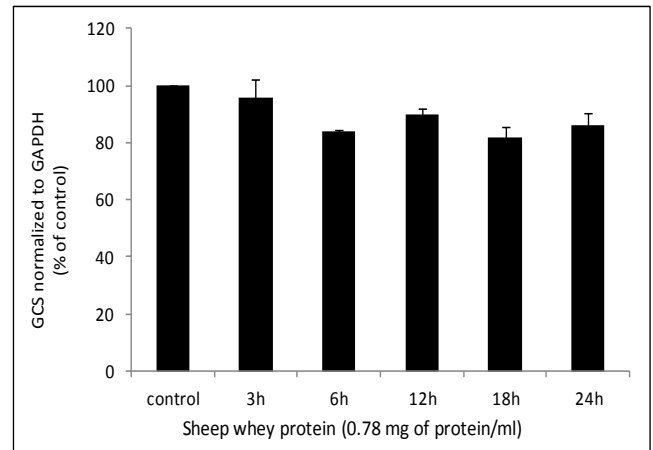
**Γράφημα 7 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της CAT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 8 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της CAT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

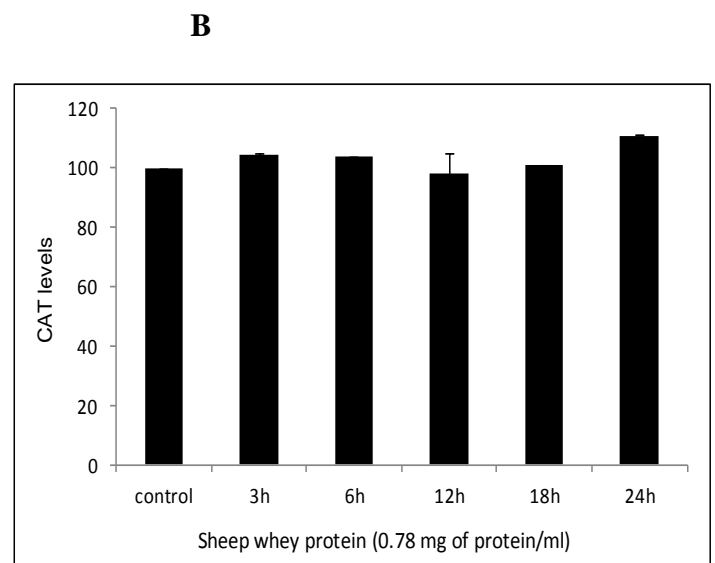
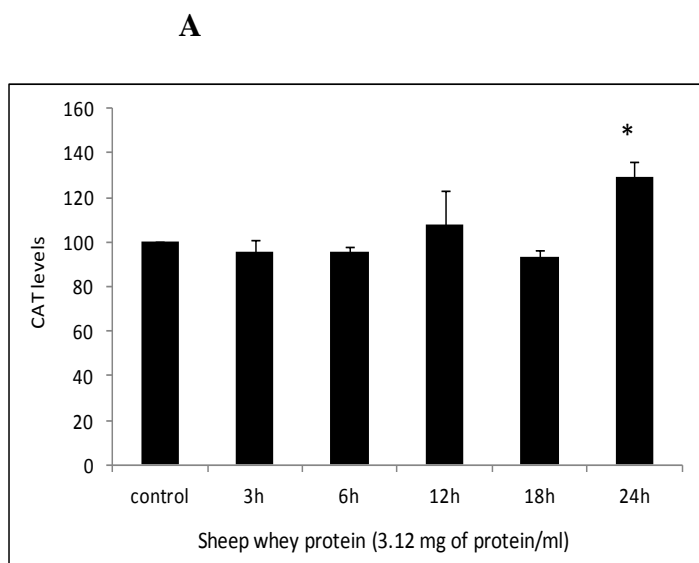


**Γράφημα 9** : Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτταρικό εκτάρωμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτταρικό εκτάρωμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

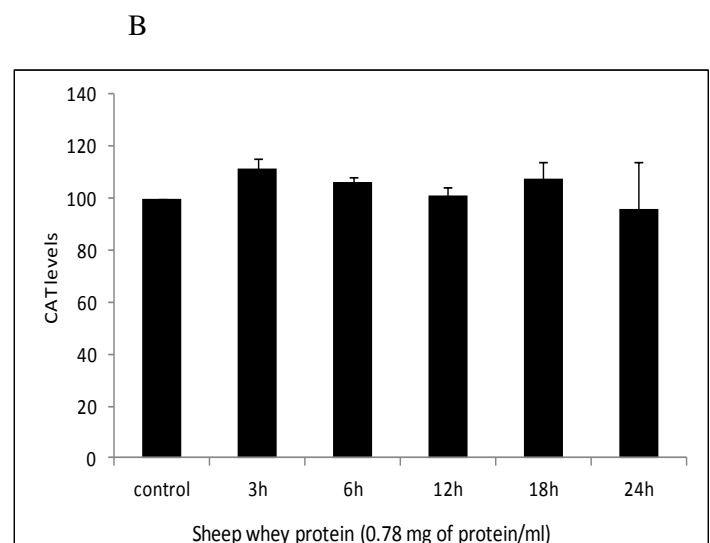
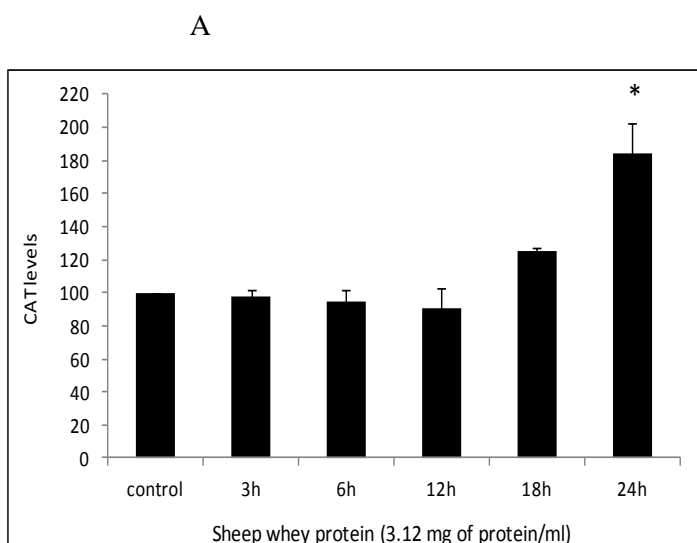
**A****B**

**Γράφημα 10** : Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

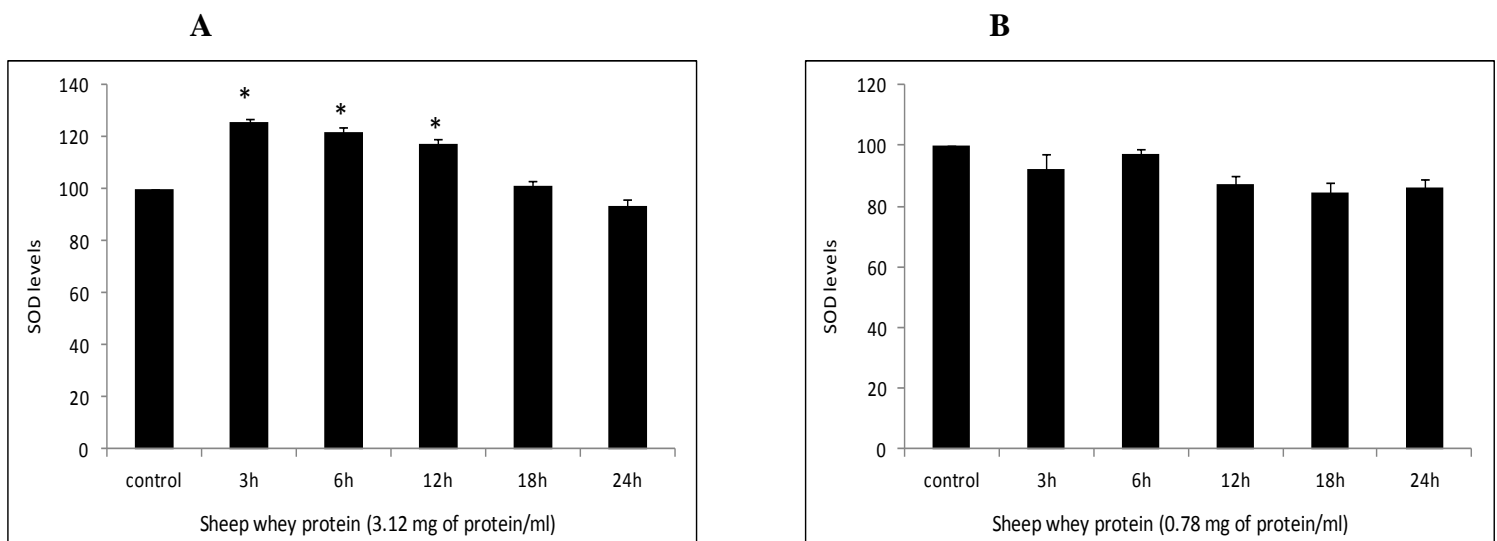




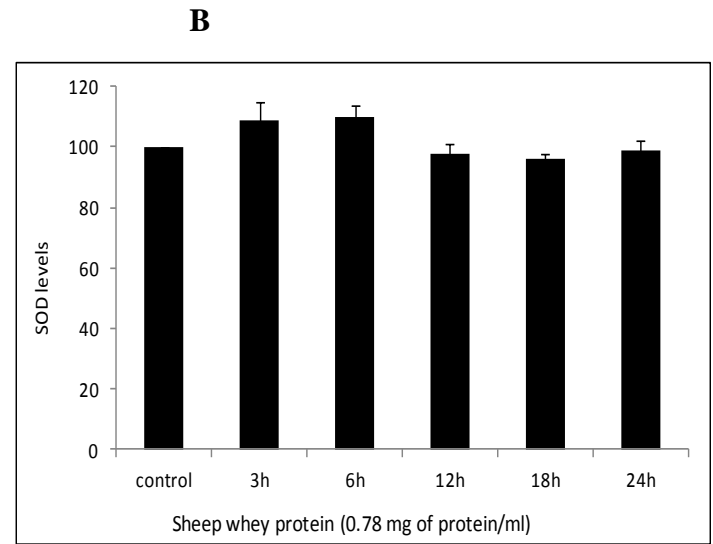
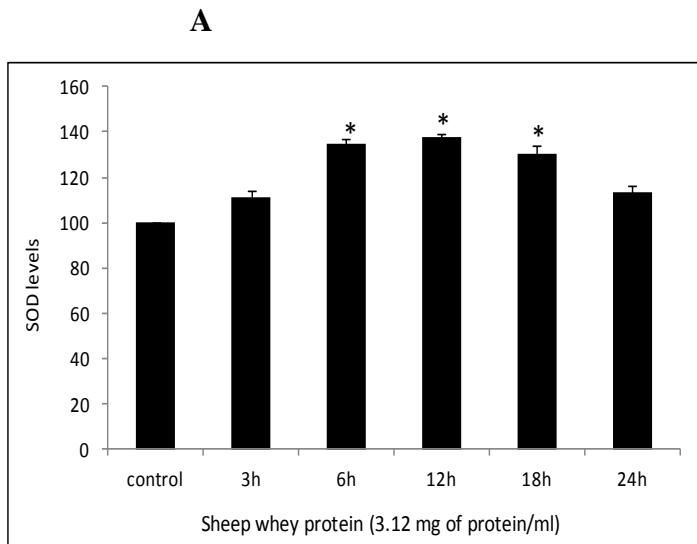
**Γράφημα 11 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



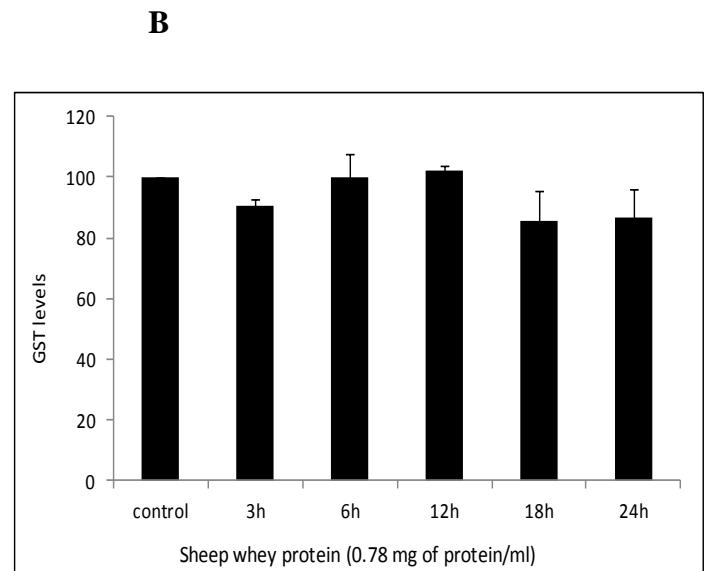
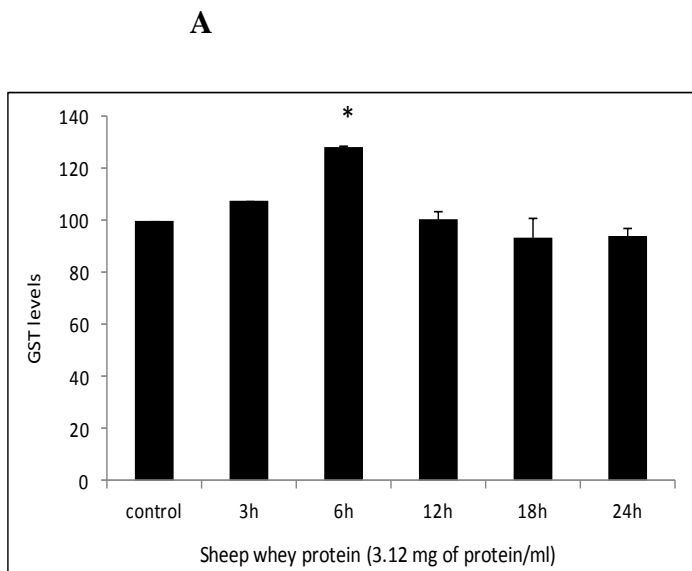
**Γράφημα 12 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



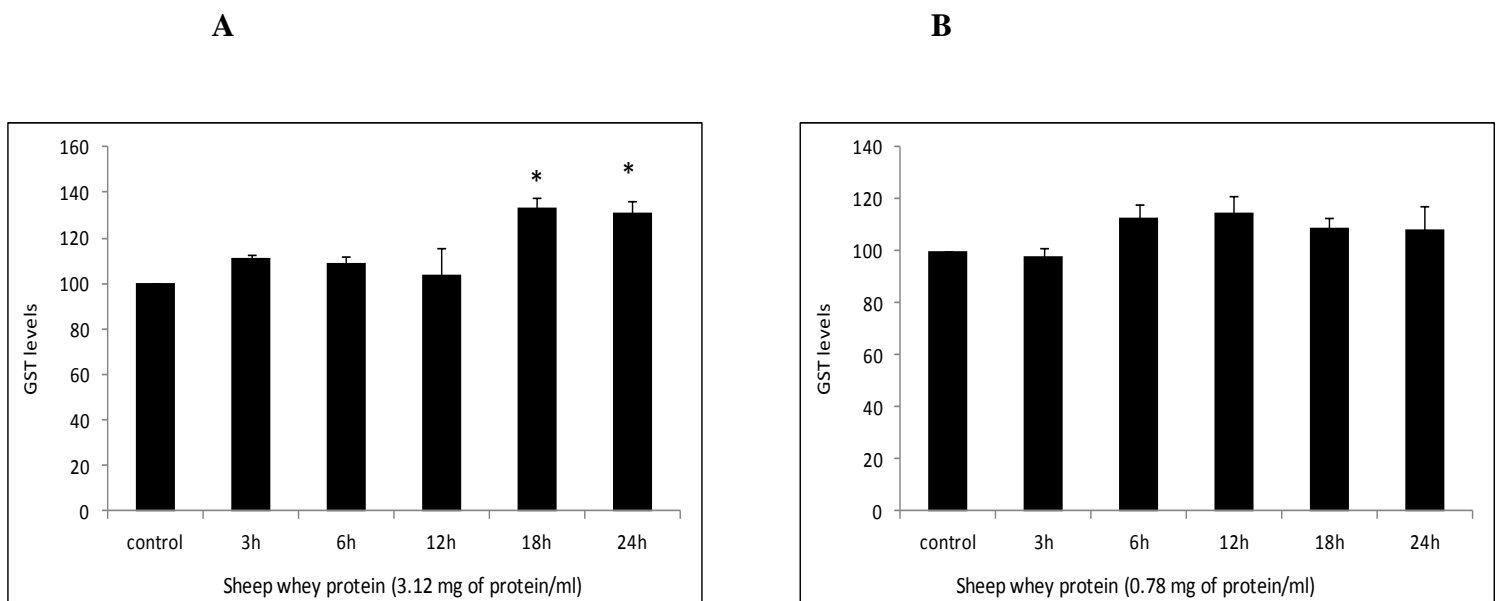
**Γράφημα 13 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 14 :** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 15** : Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 16** : Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

## 6. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2 και ενός αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων ( SOD-1, HO-1, CAT, GCS, GST) καθώς και η δράση των ενζύμων αυτών στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 βρίσκεται δεσμευμένος στο κυτταρόπλασμα με την πρωτεΐνη Keap1. Μετά την πρόκληση οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 αποδεσμεύεται από την Keap1 και μετατοπίζεται στον πυρήνα (Kensler et al., 2007) όπου προσδένεται στα AREs πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων (Rushmore & Pickett, 1990). Έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό για τον περιορισμό της μεσολαβούμενης από ROS βλάβης (Van & Kuiperij, 2005; Schreiber et al., 2007) αφού βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του η μεταγραφή ενός σημαντικού αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως SOD-1, HO-1, CAT, GCS και GST (Itoh et al., 2003).

Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε κάποια επίδραση τόσο στα επίπεδα του κυτοσολικού όσο και του πυρηνικού Nrf2. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα Ea.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος μείωσε τα επίπεδα του κυτοσολικού Nrf2 και αύξησε τα επίπεδα του πυρηνικού Nrf2. Πιθανώς η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είτε μέσω οξειδωτικής τροποποίησης της κυστεΐνης της πρωτεΐνης Keap1, η οποία συγκρατεί τον Nrf2 στο κυτοσόλιο, είτε μέσω φωσφορυλίωσης του Nrf2 μπορεί να οδηγήσει στην αποδέσμευση του και την μετατόπιση του στον πυρήνα. Πρώτον, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να δρα ως προοξειδωτικό και να οξειδώνει άμεσα το κατάλοιπο κυστεΐνης της Keap1 είτε να αλλάζει την κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση απελευθερώνοντας ROS. Δεύτερον, έχει βρεθεί ότι συμπυκνωμένα κλάσματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος χαμηλού μοριακού βάρους ενεργοποιούν τις κινάσες JNK και ERK (Tsuzi-Naito & Jack, 2012). Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να προκαλεί φωσφορυλίωση της Keap1 μέσω αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος επάγει την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 μόνο στα Ea.hy926 κύτταρα, και άρα ο μοριακός μηχανισμός της αντιοξειδωτικής της δράσης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο δρα.

Όσον αφορά τα κυτταροπροστατευτικά ένζυμα που επάγονται από τον Nrf2, μελετήθηκαν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η SOD-1, η CAT και η GCS και τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II όπως η HO-1 και η GST. Τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II είναι υπεύθυνα για την αποτοξίνωση ξеноβιοτικών ουσιών και δραστικών μεταβολιτών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε κύτταρα και ιστούς (Yang et al., 2010).

Η SOD είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει τις ενδοκυτταρικές ρίζες σουπεροξειδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Carlioz & Touati, 1986). Προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SOD-1, η οποία είναι παρούσα στο κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια, στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα C2C12 κύτταρα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα της SOD-1 έως και 32%. Παρομοίως, στα EA.hy926 κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της SOD-1 έως και 57.5%. Προσδιορίστηκε επίσης η ενζυμική δράση της SOD-1 και βρέθηκε ότι τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα αυξήθηκαν τα επίπεδα της κατά 25.5% και 37.5% αντίστοιχα. Σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος στα C2C12 κύτταρα, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της ενζυμικής δράσης της SOD κατά 44.7% (Xu et al., 2011).

Ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που μελετήθηκε τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ενζυμικής δράσης είναι η CAT. Η CAT είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ένα δραστικό μόριο που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub>. Στα C2C12 κύτταρα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα της CAT έως και 26.5%. Στα EA.hy926 κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της CAT έως και 21%. Πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης της CAT τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα και βρέθηκε ότι αυξήθηκαν τα επίπεδα της κατά 29.5% και 84% αντίστοιχα. Σε άλλη μελέτη οι Xu et al. (2011) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος στα C2C12 κύτταρα παρουσίασε αύξηση στα επίπεδα ενζυμικής δράσης της CAT.

Η GCS είναι το πρώτο ένζυμο που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της GSH. Στα C2C12 κύτταρα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της GCS έως και 24% ενώ στα EA.hy926 κύτταρα η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε κάποια επίδραση στα επίπεδα της GCS. Σε προηγούμενη μελέτη μετά από τη χορήγηση πρωτεΐνης ορού γάλακτος

σε C2C12 κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης (Kerasioti et al., 2014).

Όσον αφορά τα ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II, η HO-1 που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αποικοδόμηση των ομάδων αίμης σε βιλιβερδίνη. Θεωρείται ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό και κυτταροπροστατευτικό ένζυμο (Soares et al., 2001) που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα και ιδιαίτερα στην αγγειακή προστασία (Poss & Toneyawa, 1997; Exner et al., 2004). Η βιλιβερδίνη και το μεταβολικό προϊόν της, η βιλιρουβίνη, ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η βιλιρουβίνη ασκεί επίσης ισχυρές κυτταροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Foresti et al., 2001; Hayashi et al., 1999). Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της HO-1, τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα κατά 27.5% και 46% αντίστοιχα.

Τέλος, προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση του ενζύμου μεταβολισμού της φάσης II, GST. Τα ισόένζυμα της GST παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση διάφορων κατηγοριών ηλεκτρόφιλων, ιδιαίτερα αυτών που προκύπτουν από την ενεργοποίηση καρκινογόνων, καθώς και των ROS και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (Hartley et al., 1995; Yang et al., 2003; Landi, 2000). Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων ενζυμικής δράσης της GST τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα έως 28.5% και 33.5% αντίστοιχα. Έτσι, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος με την GST μπορεί να οδηγεί σε μείωση των ROS παρέχοντας προστασία έναντι προσβολών από διάφορους τύπους δραστικών ειδών και να προλαμβάνει την επαγωγή και ανάπτυξη καρκίνου.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Στα EA.hy926 η επαγωγή αυτών των ενζύμων οφείλεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε ενεργοποίηση του Nrf2, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του από το κυτοσόλιο στον πυρήνα. Στον πυρήνα ο Nrf2 αλληλεπιδρά με έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων και στη συνέχεια προσδένεται στα AREs, τα οποία είναι παρόντα στους υποκινητές γονιδίων της φάσης II, αυξάνοντας τη μεταγραφή τους. Στα C2C12 κύτταρα παρατηρήσαμε ότι ενώ δεν είχαμε ενεργοποίηση του Nrf2 είχαμε αύξηση των αντιοξειδωτικών

ενζύμων και των ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι στα C2C12 μπορεί να είναι ενεργοποιημένο κάποιο άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο οδηγεί στη μεταγραφή αυτών των γονιδίων και το οποίο παρεμβάλλεται στην ενεργοποίηση του Nrf2.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 ως αποτέλεσμα της επαγωγής ενός αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2/ARE και στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μέσω ενεργοποίησης κάποιου άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού μη-εξαρτώμενου του Nrf2 για το οποίο χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για την εξακρίβωση του. Τέλος, δεδομένου ότι το μονοπάτι Nrf2/ARE λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως θεραπευτικός στόχος για διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκινογένεσεις στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες.



## 7. Βιβλιογραφία

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
- Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:936–944.
- Ashok BT, Ali R. The aging paradox: Free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999, 34:293–303.
- Bielski BHJ and Cabelli DE (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active Oxygen in Chemistry*. Foole CS, Valentine JS, Greenber A, Liebman JF(eds). Chapman and Hall, London, pp.66-104.
- Bonang G, Monintja HE, Sujudi, van der Waaij D. Influence of breastmilk on the development of resistance to intestinal colonization in infants born at the Atma Jaya Hospital, Jakarta. *Scand J Infect Dis*.
- Bounous G, Kongshavn PA. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr* 1985;115:1403-1408.
- Boveris A and Cadenas E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In *Oxygen, gene expression, and cellular function* (Clerch, L. B. and Massaro, D. J., eds. ). Pp. 1-25, Mercel Dekker, New York.
- Buettner GR. The pecking order of free-radicals and antioxidants – Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300:535–543.
- Carlioz, A., Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *E. coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.*, 5, 623–630. Fridovich, I., (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58, 61–97.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Crinnion WJ. Environmental medicine, part 2– health effects of and protection from ubiquitous airborne solvent exposure. *Altern Med Rev* 2000;5:133-143.

- Daenzer M, Petzke KJ, Bequette BJ, Metges CC. Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J Nutr* 2001;131:1965- 1972.
- Dickinson, D. A., Levonen, A. L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley- Usmar, V. M. and Forman, H. J. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1152–1159.
- Dinkova-Kostova A.T. , W.D. Holtzclaw, R.N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, et al., Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002)11908–11913.
- 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.
- Downey JM (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52: 487-504.
- Edge R, MCGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants – A review. *J Photochem Photobiol B* 1997, 41:189– 200.
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983).
- Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* 72:153-165.
- Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, M. (2004). The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1097–1104.
- Fang YZ, Yang S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002, 18:872–879.
- Foresti, R., Goatly, H., Green, C.J., Motterlini, R. (2001). Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, 1976–1984.
- Galati G, Tafazoli S, Sabzevari O, Chan T, O’brein P. Idiosyncratic Nsaid drug induced oxidative stress. *Chem Biol Interact* 2002, 142:25–41.

- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In: Buttriss J, Saltmarsh M, eds. *Functional Foods II – Claims and Evidence*. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press; 2000:82-90.
- Griffith O.W. , R.T. Mulcahy, The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73 (1999) 209–267.
- Guimont C, Marchall E, Girardet JM, Linden G. Biologically active factors in bovine milk and dairy byproducts: influence on cell culture. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997;37:393-410.
- Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem* 2003;14:251-258.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.* 249, 7130-7139.
- Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S.J, Tamatani, T., Kitajima, M., Makino, N., Ishimura, Y., Suematsu, M. (1999). Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 85, 663–671.
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*.
- Halliwell B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? *Free Rad Res* 1996, 25:439–454.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2<sup>nd</sup> ed.) Oxford: *Clarendon Press*, pp 136-158.

- Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzymology 186, 1990.
- Hartley, D.P., Ruth, J.A., Petersen, D.R. (1995) The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. Arch. Biochem. Biophys. 316, 197–205.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol 300:156-166.
- Hojo Y. Sequential study on glutathione peroxidase and selenium contents of human milk. *Sci Total Environ* 1986;52:83-91.
- Huang C.S., M.E. Anderson, A. Meister, Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase, J. Biol. Chem. 268 (1993) 20578–20583.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O’Connor, T., Yamamoto, M., (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic–nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*. 8, 379–391.
- Jain AK, Mahajan S, Jaiswal AK. Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of Nrf2: a novel mechanism in Nrf2 activation. *J Biol Chem* 2008; 283: 17712–20.
- Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998, 14:1511–1527.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.
- Kanner J and Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31: 1388-1395.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116.

- Kerasiotti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D (20014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells, *Food Chem.* 2014 Jul 15;155:271-8.
- Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000, 267:4928–4944.
- Kojoda G, Harrison Dg. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999, 43:562–567.
- Koppenol, W. H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 25 : 389-391 ; 1998.
- Koren HS (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect* 103: 235-242.
- Kulczycki A Jr, MacDermott RP. Bovine IgG and human immune responses: Con A-induced mitogenesis of human mononuclear cells is suppressed by bovine IgG. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;77:255-258.
- Kuppasamy P and Zweier JL (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264: 9880-9884.
- Kussendrager KD, van Hooijdonk AC. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br J Nutr* 2000;84:S19-S25.
- Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.* 463, 247–283.
- Levine RL and Stadtman ER (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol* 36: 1495-1502.
- Lijinsky W (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443: 129-138.
- Losso JN, Dhar J, Kummer A, et al. Detection of antibody specificity of raw bovine and human milk to bacterial lipopolysaccharides using PCFIA. *Food Agric Immunol* 1993;5:231-239.000;32:189-196.
- Marz R. *Medical Nutrition from Marz*, 2nd ed. Portland, OR: Omni Press; 2002.

- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577–586
- Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364.
- Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo* 13: 295-309.
- Nagaoka S. Studies on regulation of cholesterol metabolism induced by dietary food constituents or xenobiotics. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1996;49:303-313.
- Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
- Nogueira Cw, Zeni G, Rocha Jbt. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *ChemRev* 2004, 104:6255–6285
- Numazawa S. , T. Yoshida, Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect, *J. Toxicol. Sci.* 29 (2004) 81–89.
- Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906:170-175.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003, 333:19–39.
- Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 80, 3734-3737.
- Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur J Biochem.*
- Pihlanto-Leppala A, Koskinen P, Piilola K, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* 2000;67:53-64.

- Poss, K.D., Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 10925–10930.
- Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.
- Rushmore, T.H., Pickett, C.B., (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene: characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 14648–14653.
- Sen, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of glutathione. *Nutritional Biochemistry* 8, 660–672.
- Schreibelt, G., van Harsen, J., van Rossum, S., Dijkstra, C.D., Drukarch, B., de Vries, H.E., (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res. Rev.* 2, 322–330.
- Soares MP, Brouard S, Smith RN, Bach FH (2001) Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol Rev* 184: 275–285.
- Stadtman ER (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 11: 11-12.
- Sundberg J, Ersson B, Lonnerdal B, Oskarsson A. Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man – a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicology* 1999;137:169-184.
- Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol* 2002;80:109-112. 1991;196:177-184.
- Tsuzi-Naito, K., Jack, R.W. (2012). Concentrated bovine milk whey active proteins facilitate osteogenesis through activation of the JNK-ATF4 pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1150-1154.
- Tu Z. and Anders M. W. (1998) Expression and characterisation of human glutamate cysteine ligase. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 247–254.

- Van, M.F.L., Kuiperij, H.B., (2005). The Nrf2-ARE signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Curr. Drug. Targets. CNS Neurol.Disord.* 4, 267–281.
- Valko M, Rhodes Cj, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160:1–40.
- Victoria K (1994). Review oh the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res* 317 : 43-55.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002;42:353-375.
- Von Sonntag C (1987). *The Chemical Basis of radiation Biology*. Taylor & Francis, London.
- Xu, R., Liu, N., Xu, X., Kong, B. (2011). Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J. Dairy Sci.* 94, 3739–3746.
- Yaffe, D. & Saxel, O. *Differentiation* 7, 159–166 (1977).
- Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim. Pol.* 50, 319–336.
- Yang YM, Noh K, Han CY, Kim, S.G. (2010). Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules.* 15, 6332–6348