



Μελέτη επίδρασης της αιγοπρόβειας
πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε δείκτες
οξειδωτικού στρες σε μυοβλάστες
ποντικού (C2C12)

Effect of goat whey protein on oxidative
stress markers in mouse myoblasts (C2C12)

Πτυχιακή εργασία

Πρίφτης Αλέξανδρος

Λαρισα 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας(επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας 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, όπου ασχολήθηκα 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 βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής 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.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Περιεχόμενα εικόνων..... | 7 |
| Περιεχόμενα πινάκων και γραφημάτων:..... | 8 |
| 1. Περίληψη..... | 9 |
| 2. Εισαγωγή..... | 10 |
| 2.1 Ελεύθερες ρίζες..... | 10 |
| 2.1.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)..... | 12 |
| 2.1.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})..... | 12 |
| 2.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)..... | 13 |
| 2.1.4 Μονήρες οξυγόνο (1O_2)..... | 13 |
| 2.1.5 Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)..... | 14 |
| 2.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου..... | 14 |
| 2.2.1 Ενδοκυτταρικές πηγές:..... | 14 |
| 2.2.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση..... | 14 |
| 2.2.1.β. Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»..... | 15 |
| 2.2.1.γ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ..... | 16 |
| 2.2.1.δ. Κυτόχρωμα P_{450} | 17 |
| 2.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων..... | 17 |
| 2.2.2 Εξωκυτταρικές πηγές :..... | 17 |
| 2.3 Βιολογική Δράση Των ROS:..... | 18 |
| 2.3.1 Θετικές επιδράσεις..... | 18 |
| 2.3.2 Επιβλαβείς επιδράσεις..... | 19 |
| 2.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί..... | 22 |
| 2.4.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί:..... | 22 |
| 2.4.1.α.Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)..... | 22 |
| 2.4.1.β. Καταλάση (CAT)..... | 23 |
| 2.4.1.γ. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)..... | 24 |
| 2.4.1.δ. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)..... | 24 |
| 2.4.2 Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί..... | 25 |
| 2.4.2.α. Γλουταθειόνη..... | 25 |
| 2.4.2.β. Βιταμίνη C..... | 27 |
| 2.4.2.γ. Β-καροτένιο..... | 27 |
| 2.4.2.δ. Βιταμίνη E..... | 28 |
| 2.4.2.ε. Συνένζυμο Q 10..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.4.2.στ. Σελήνιο | 29 |
| 2.5 Οξειδωτικό Στρες..... | 29 |
| 2.5.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες | 30 |
| 2.6 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein) | 32 |
| 2.6.1 Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος | 35 |
| 2.7 tert- Βούτυλο υδροϋπεροξείδιο (T-BOOH)..... | 36 |
| 3. Σκοπός | 37 |
| 4.Υλικά και μέθοδοι | 38 |
| 4.1. Υλικά | 38 |
| 4.1.1. Χημικά αντιδραστήρια..... | 38 |
| 4.1.2. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος | 38 |
| 4.1.3 Μυϊκά κύτταρα C2C12..... | 39 |
| 4.2. Μέθοδοι..... | 40 |
| 4.2.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12) | 40 |
| 4.2.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο ΧΤΤ | 41 |
| 4.2.2.α. Αρχή μεθόδου | 41 |
| 4.2.2.β. Πειραματική διαδικασία..... | 42 |
| 4.2.3 Κυτταρομετρία Ροής..... | 43 |
| 4.2.4 Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH..... | 46 |
| 4.2.5 Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) | 47 |
| 4.2.5.β. Πειραματική διαδικασία..... | 47 |
| 4.2.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS | 48 |
| 4.2.6.α. Αρχή μεθόδου | 48 |
| 4.2.6.β. Πειραματική διαδικασία..... | 48 |
| 4.2.6.γ. Υπολογισμοί | 49 |
| 4.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford ... | 49 |
| 4.2.8 Στατιστική ανάλυση..... | 50 |
| 5. Αποτελέσματα..... | 50 |
| 5.1 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ. | 50 |
| 5.2 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής | 51 |
| 5.3 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής..... | 55 |
| 5.4 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) | 59 |

| | |
|---------------------|----|
| 6. Συζήτηση..... | 60 |
| 7.Βιβλιογραφία..... | 65 |

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN

Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εικόνα 3: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Εικόνα 4: Μηχανισμός πρωτεϊνικής οξειδωσης

Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης της SOD

Εικόνα 6: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT

Εικόνα 7: Δομή γλουταθειόνης

Εικόνα 8: Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τις βιταμίνες E και C

Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εικόνα 10: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

Εικόνα 11: Βιοσύνθεση γλουταθειόνης

Εικόνα 12: Δομή του T-BOOH

Εικόνα 13: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του T-BOOH

Εικόνα 14: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

Εικόνα 15: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

Εικόνα 16: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer , β) 96-well plate

Εικόνα 17: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής

Εικόνα 18: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

Εικόνα 19: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη γλουταθειόνη, τις ελεύθερες ρίζες και τα TBARS στα κύτταρα C2C12

Εικόνα 20: Αντίδραση του TBA με την MDA

Περιεχόμενα πινάκων και γραφημάτων:

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

Πίνακας 3: Συστατικά τυρογάλακτος

Γράφημα 1: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των C2C12 κυττάρων από την πρωτεΐνη τυρογάλακτος

Γράφημα 2: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH (P<0.05).

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

Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BOOH

Γράφημα 5: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH (P<0.05).

Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BOOH.

Γράφημα 8: Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control.* Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH (P<0.05).

1. Περίληψη

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Έτσι καθίσταται αναγκαία η εύρεση νέων αντιοξειδωτικών ουσιών που θα μπορούν να λαμβάνονται ως συμπληρώματα διατροφής ασκώντας προστατευτική δράση.

Γι' αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης του τυρογάλακτος σε μυοβλάστες ποντικού (σειρά C2C12). Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής και τα επίπεδα των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) φασματοφωτομετρικά.

Αναλυτικότερα, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέθοδος XTT για να προσδιορίσουμε την κυτταροτοξική συγκέντρωση της πρωτεΐνης, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν είχε τοξική δράση στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml). Στη συνέχεια, υπολογίσαμε τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κύτταρα που επώαστηκαν με τις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης για 24h και στη συνέχεια τους χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide) (0,3 mM) για 30 λεπτά. Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο t-BOOH μείωσε τα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 32,6% σε σχέση με το control ενώ στα κύτταρα που τους χορηγήθηκε και πρωτεΐνη τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 47,6%, 115,7%, 122% και 143,7%, σε σχέση με τα επίπεδα της μετά τη χορήγηση του t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml αντίστοιχα.

Η ίδια πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τον υπολογισμό των ROS. Η χορήγηση του t-BOOH δεν φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στα επίπεδά τους. Η χορήγηση της πρωτεΐνης στις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml οδήγησε σε μείωση των επιπέδων ROS κατά 3,4 %, 13,4%, 16,5% και 41,4% αντίστοιχα.

Η τελευταία μέθοδος που πραγματοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης). Η χορήγηση του t-BOOH αύξησε σημαντικά τα TBARS κατά 29% σε σχέση με το control, ενώ η χορήγηση της πρωτεΐνης μείωσε τα αυξημένα τους επίπεδα μετά τη χορήγηση του t-BOOH κατά 21,7%, 15%, 25,5% και 24% για τις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml αντίστοιχα.

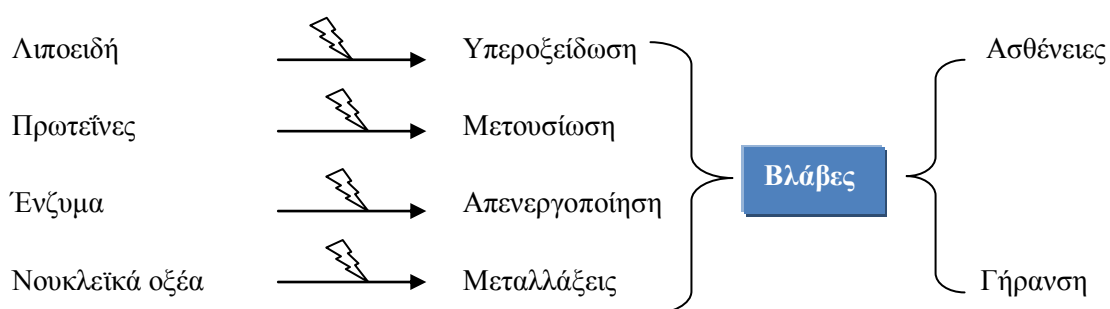
Έτσι, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος δείχνει να έχει αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται αυτή η δράση.

2. Εισαγωγή

2.1 Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και ενεργά καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηκότητά τους γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστηκή από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).



Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται γενικά ο όρος δραστηκές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\cdot-}$, και το OH^{\cdot} .

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 ($COCl$).

| ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ | |
|--|------------------------------------|
| <u>Radicals</u> | <u>Non-radicals</u> |
| Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) | Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2) |
| Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot}) | Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$) |
| Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}) | Υποβρωμιώδες Οξύ $HOBr$ |
| Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot}) | Όζον (O_3) |
| Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) | Μονήρες Οξυγόνο (1O_2) |

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

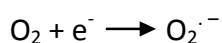
Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το αζώτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO^{\cdot} και το διοξείδιο του αζώτου NO_2^{\cdot} καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $ONOO^{\cdot-}$) (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

| ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ | |
|---|-------------------------------------|
| <u>Radicals</u> | <u>Non-radicals</u> |
| Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^{\cdot}) | Νιτρώδες Οξύ (HNO_2) |
| Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^{\cdot}) | Κατιόν Νιτροσυλίου (NO^+) |
| | Ανιόν Νιτροσυλίου ($NO^{\cdot-}$) |

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

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

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

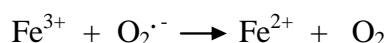


Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο O_2 από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου. Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί επίσης να σχηματιστεί από φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια της δράσης τους.

Μικρότερες ποσότητες $O_2^{\cdot-}$ παράγονται σαν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ινοβλαστών. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ.

2.1.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})

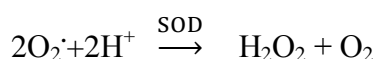
Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υπεροξειδίου 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 μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου



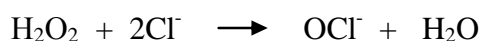
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το OH[·]. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων.

2.1.4 Μονήρες οξυγόνο (¹O₂)

Το ¹O₂ (singlet oxygen) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη) και αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το ¹O₂ σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

2.1.5 Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Προκύπτει από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) με το χλώριο (Cl), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση και είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H₂O₂ και το O₂^{•-}



2.2 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Υπάρχουν τόσο ενδοκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.

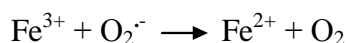
2.2.1 Ενδοκυτταρικές πηγές:

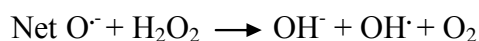
2.2.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. 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 O₂^{•-} και H₂O₂ (Chance et al., 1979). Το H₂O₂ δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O₂^{•-} (Chance et al., 1979). Το O₂^{•-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O₂^{•-} και στο H₂O₂ δημιουργείται OH[•].

Αντίδραση Haber-Weiss:





Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) (Korpeno1, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες $\text{OH}\cdot$ και $\text{NO}_2\cdot$.

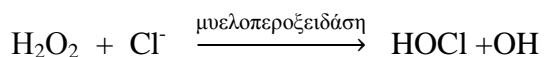
Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Boveris and Cadenas, 1997).

2.2.1.β. Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

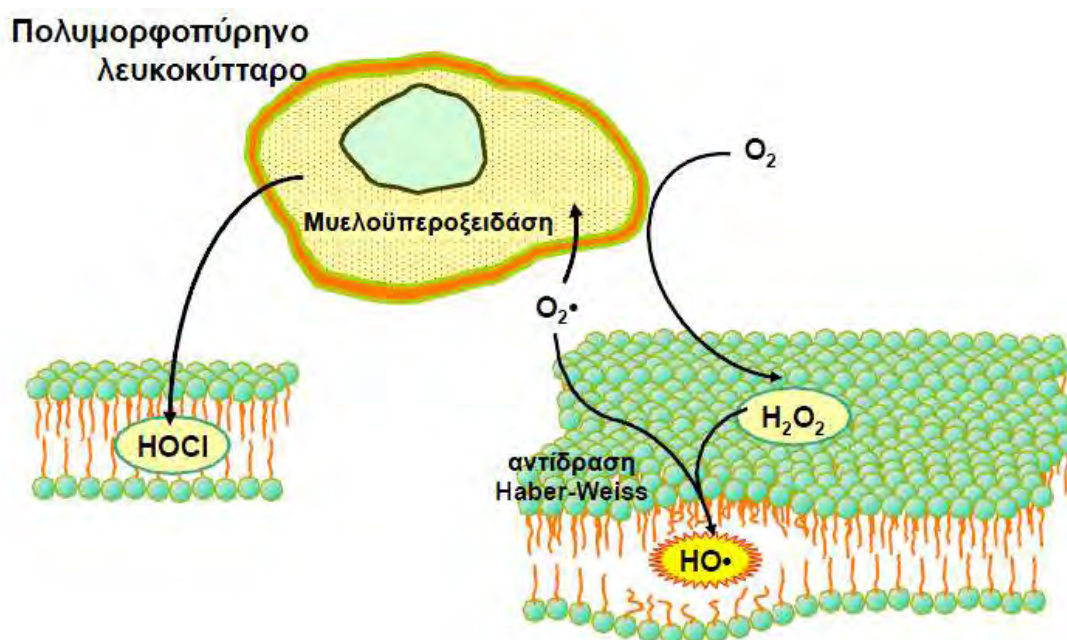
Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani and Evans, 1979).

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $\text{O}_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $\text{O}_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petroni et al., 1992). Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $\text{O}_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε $\text{OH}\cdot$ από ιόντα μετάλλων ή σε HOCl .



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani and Evans, 1979; Meydani et al., 1992). Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει HOCl όπως είδαμε.



Εικόνα 1: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN

2.2.1.γ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuprasamy and Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται 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 $O_2^{\bullet-}$.

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 οξυγόνου είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

2.2.1.δ. Κυτόχρωμα P_{450}

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P_{450} (Yu, 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $\text{O}_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια 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 $\text{O}_2^{\cdot-}$.

2.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων

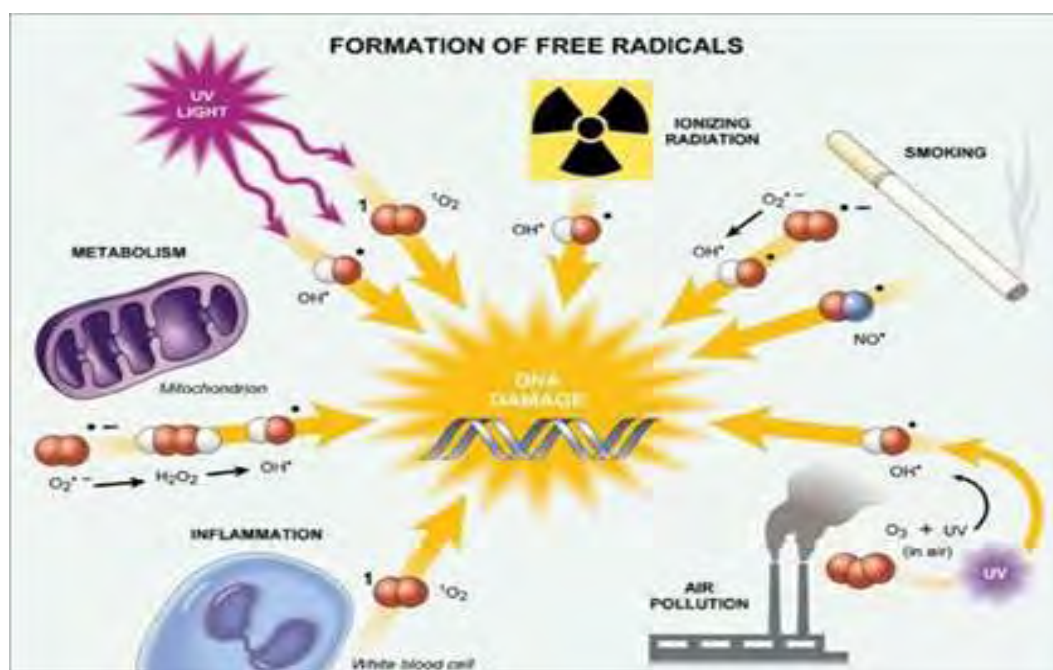
Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

2.2.2 Εξωκυτταρικές πηγές :

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα (Koren, 1995; Victoria, 1994) είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες.

Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξеноβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000).

Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

2.3 Βιολογική Δράση Των ROS:

2.3.1 Θετικές 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). Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών. Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης (Finaud et al., 2006). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

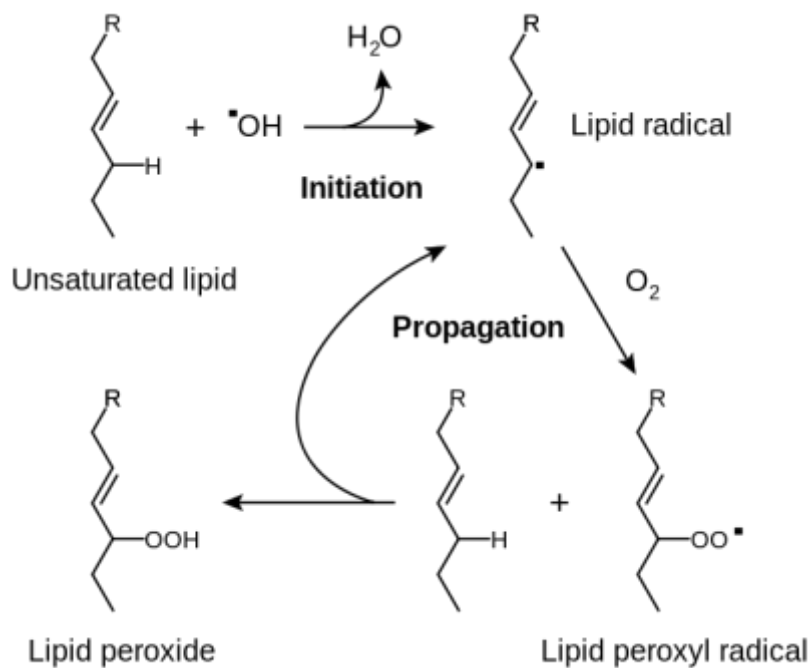
Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001; Linnane et al., 2002). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα

την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

2.3.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

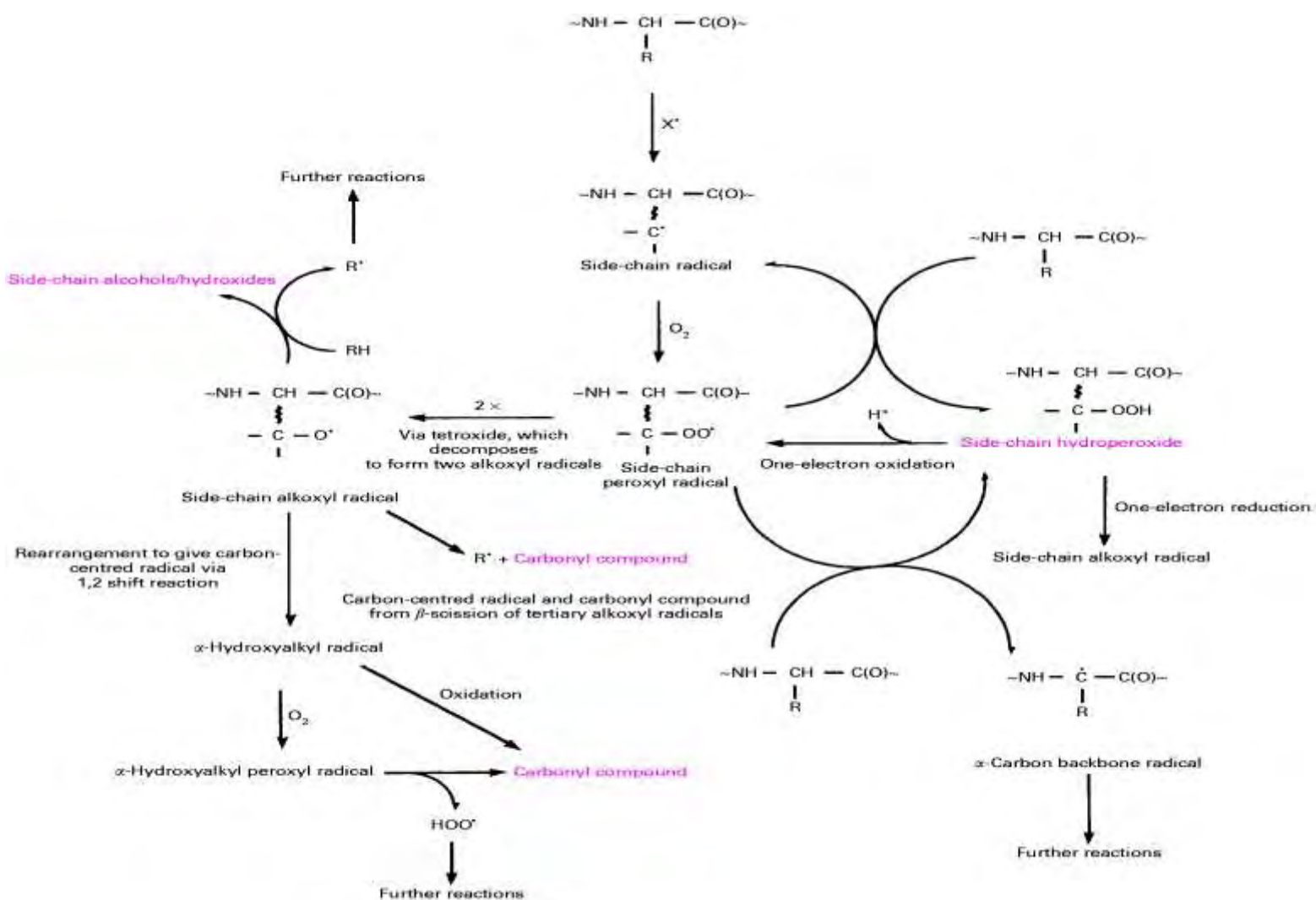
Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

Λιπίδια: Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε 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).



Εικόνα 3: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Πρωτεΐνες: Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $\text{OH}\cdot$, το $\text{RO}\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. 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: Μηχανισμός πρωτεϊνικής οξειδωσης

DNA: Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου(OH•) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol,

1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002q Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).

2.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

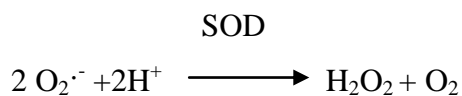
- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια
- Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

2.4.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί:

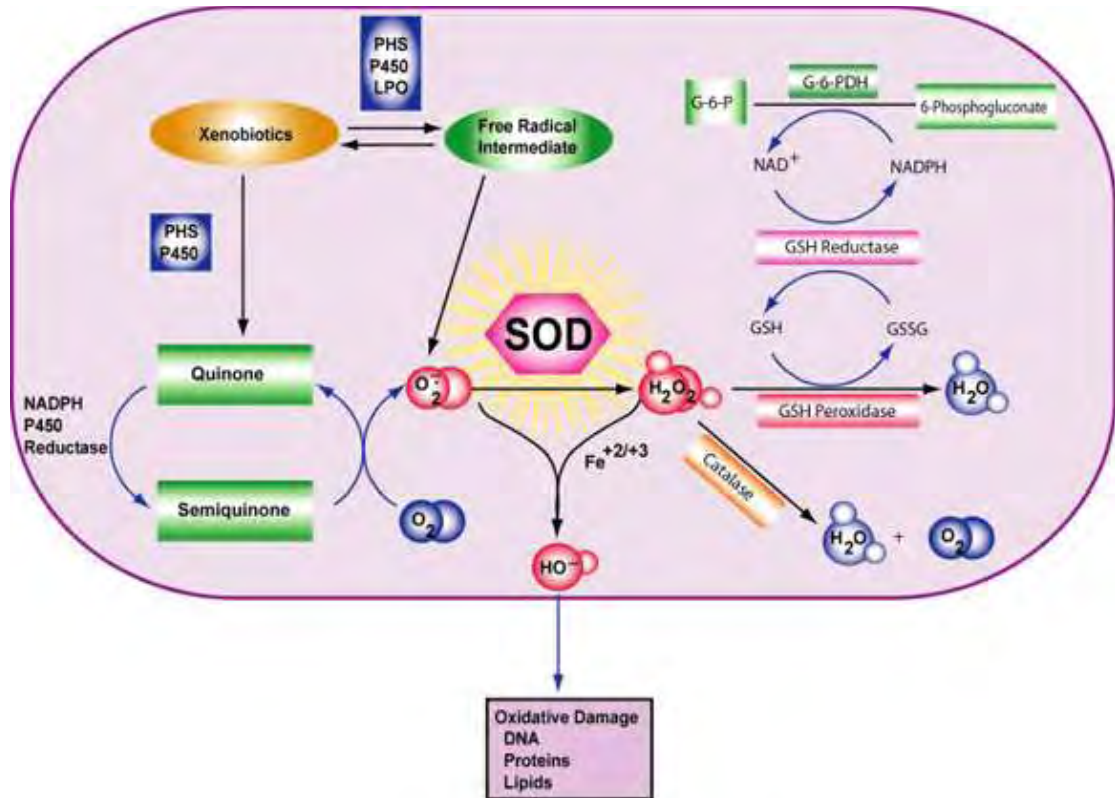
Περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

2.4.1.α.Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



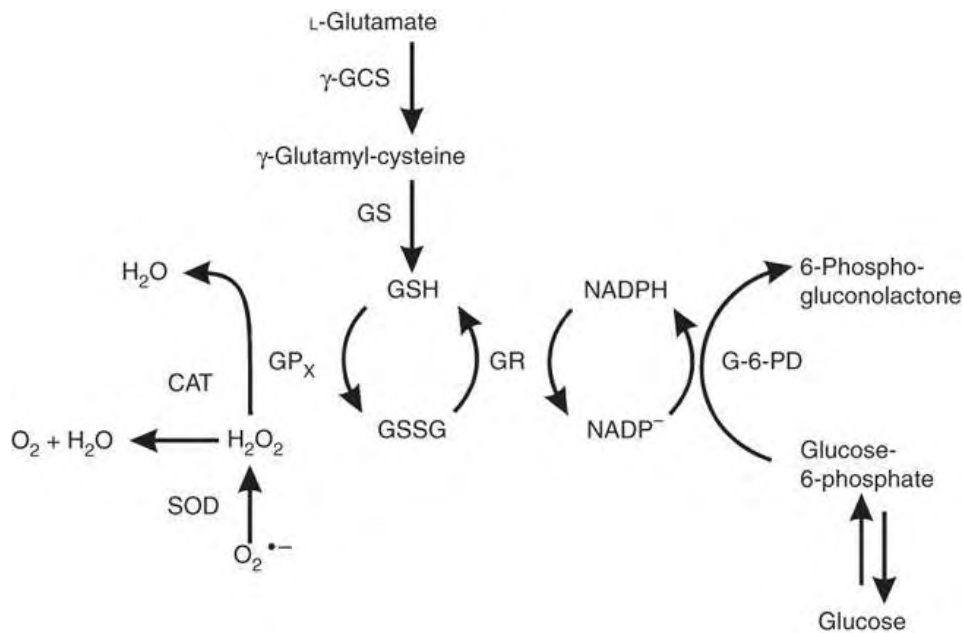
Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, η Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης της SOD

2.4.1.β. Καταλάση (CAT)

Εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500αα, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



Εικόνα 6: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT

2.4.2 Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη βιταμίνη E, τη βιταμίνη C, το β-καροτένιο, τη γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

2.4.2.α. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό δεδομένου ότι μπορεί να συντεθεί στο σώμα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος. Η κύρια αποστολή της είναι η διάσπαση και απομάκρυνση όλων των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Η γλουταθειόνη είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη ενώ ταυτόχρονα διατηρεί κάποια

εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E στην ανηγμένη (ενεργή) μορφή τους (Scholz RW et al, 1989). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης της από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο.

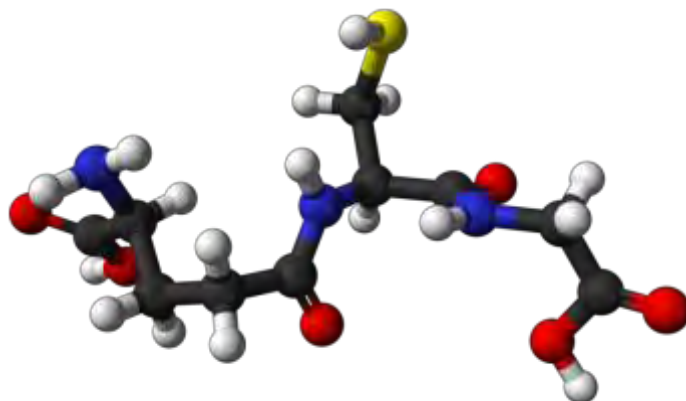
Η γλουταθειόνη εκτός από αντιοξειδωτική δράση έχει πολλαπλές λειτουργίες:

1. Μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμο για τη ζωή.
2. Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων. Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το γαστρεντερικό σύστημα και οι πνεύμονες.
3. Έχει σημασία για το μεταβολισμό του σιδήρου.

Η αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης μέσω των συμπληρωμάτων είναι δύσκολη. Η έρευνα δείχνει ότι η γλουταθειόνη που λαμβάνεται από το στόμα δεν απορροφάται καλά σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Η καλσιτριόλη, ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D που συντίθεται στους νεφρούς, αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στον εγκέφαλο και φαίνεται να είναι ένας καταλύτης για την παραγωγή της γλουταθειόνης. Επιπλέον, στο πλάσμα και το ήπαρ η γλουταθειόνη μπορεί να αυξηθεί με ορισμένα συμπληρώματα που χρησιμεύουν ως πρόδρομες ουσίες της γλουταθειόνης όπως η N-ακετυλοκυστεΐνη, η S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) και οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος. Το α-λιποϊκό οξύ έχει αποδειχθεί επίσης ότι βοηθά για να αποκατασταθεί η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη. Η μελατονίνη έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει ένα ένζυμο, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και το γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum*) έδειξε επίσης την ικανότητα να αναπληρώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε αρουραίους.

Η γλουταθειόνη είναι ένα αυστηρά ελεγχόμενο ενδοκυττάριο συστατικό και η σύνθεσή της ελέγχεται από επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η αύξηση της γλουταθειόνης με χορήγηση πρόδρομων ουσίες για τη βιοσύνθεση της ή η ενδοφλέβια χορήγηση γλουταθειόνης είναι στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την

αντιμετώπιση καταστάσεων όπως ανεπάρκεια του τριπεπτιδίου, υψηλό οξειδωτικό στρες και ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.



Εικόνα 7: Δομή γλουταθειόνης

2.4.2.β. Βιταμίνη C

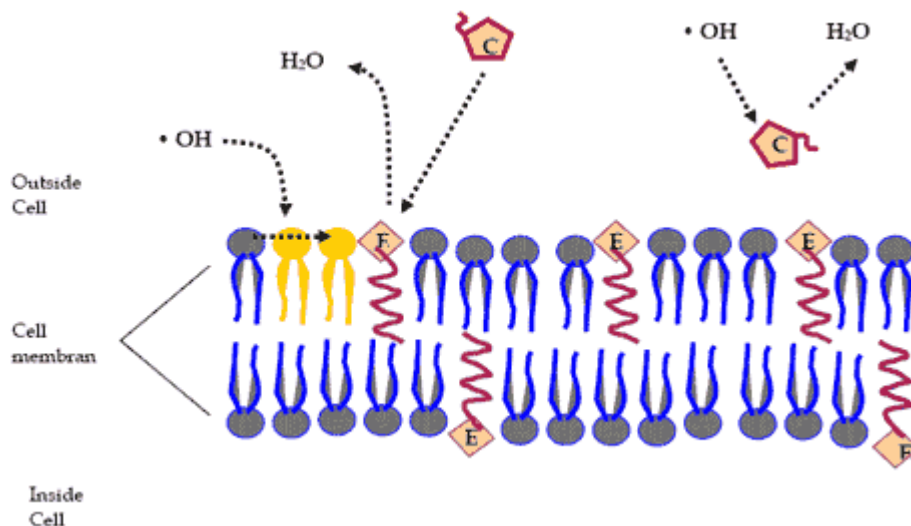
Η βιταμίνη C είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο. Αποτελεί συμπράγοντα σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις ενώ παράλληλα έχει και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς είναι δότης ηλεκτρονίων με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες.

2.4.2.γ. Β-καροτένιο

Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και με το σελήνιο. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης.

2.4.2.δ. Βιταμίνη E

Είναι μια ομάδα 8 λιποδιαλυτών βιταμινών με πιο δραστική την α-τοκοφερόλη. Απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων. Ειδικότερα, η α-τοκοφερόλη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 8: Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τις βιταμίνες E και C

2.4.2.ε. Συνένζυμο Q 10

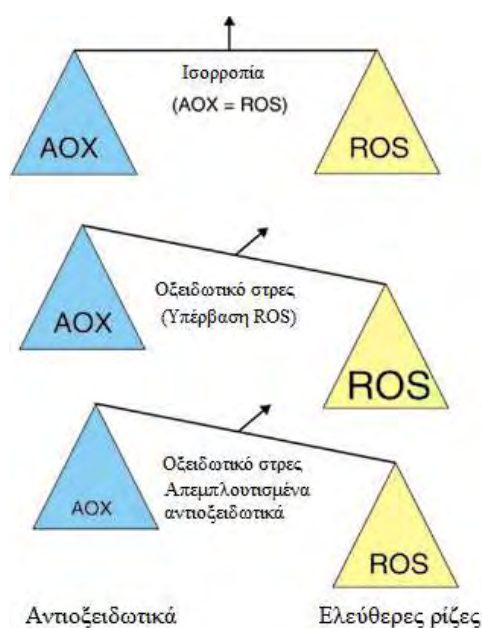
Το συνένζυμο Q 10 (ουβικινόνη) παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξειδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για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

2.4.2.στ. Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Ως συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

2.5 Οξειδωτικό Στρες

Πρόκειται για διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών, με αποτέλεσμα είτε να υπερπαράγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Η ανισορροπία στην οποία οφείλεται το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και 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

2.5.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια), παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.

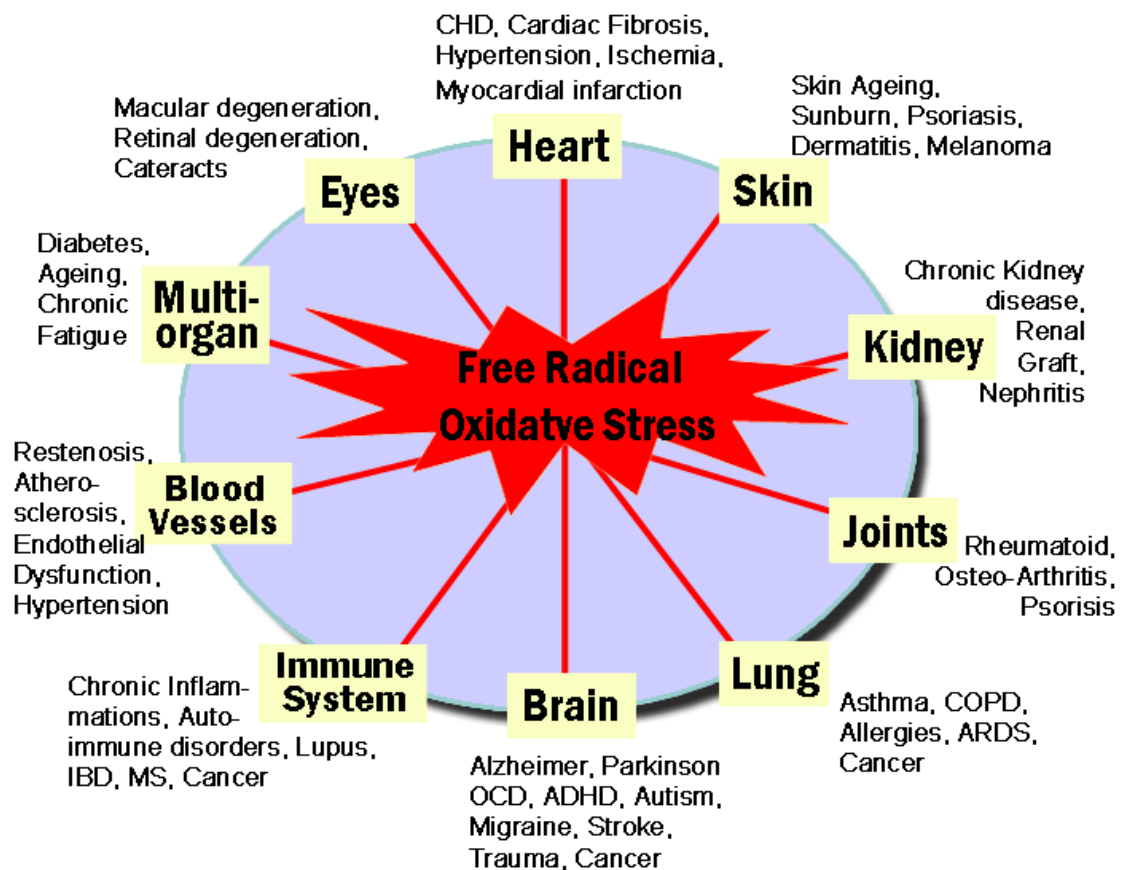
Οι πρωτεΐνες όπως αναφέρθηκε μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του, είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις.

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη

νέκρωση το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Σε επίπεδο οργάνων και οργανισμού, το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε αρκετές εξ αυτών:



Εικόνα 10: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

2.6 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey protein)

Ο ορός γάλακτος (τυρόγαλο) προέρχεται από το γάλα, είναι παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής τυριού και θεωρούνταν λανθασμένα ρύπος. Ωστόσο το μίγμα πρωτεϊνών που περιέχει (λακτοφερίνη, α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη, γλυκομακροπεπτίδιο και ανοσοσφαιρίνες) το καθιστούν ως ένα πολύ χρήσιμο διατροφικό στοιχείο έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία.

Αναλυτικότερα έχει δειχθεί σε μελέτες ότι εμφανίζει ιδιότητες όπως: ανοσοενισχυτικό, αντιυπερτασικό, υπολιπιδαιμικό, αντικαρκινικό, αντιικό, αντιβακτηριακό, έχει δράση χηλικού παράγοντα και τέλος αντιοξειδωτικό.

| Πρωτεΐνη τυρογάλακτος | % συνολικής πρωτεΐνης | Οφέλη |
|---------------------------|-----------------------------|--|
| Β-λακτοσφαιρίνη | 50-55% | Πηγή απαραίτητων αα και αα διακλαδισμένης αλυσίδας |
| Α-λακταλβουμίνη | 20-25% | Είναι και η κύρια πρωτεΐνη του ανθρώπινου γάλακτος, πηγή απαραίτητων και διακλαδισμένων αα |
| Ανοσοσφαιρίνες | 10-15% | Βασική πρωτεΐνη του ανθρώπινου γάλακτος, ανοσορυθμιστική |
| Λακτοφερίνη | 1-2% | Αντιοξειδωτική, αντιική, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, προωθεί την αύξηση ενδογενούς χλωρίδας |
| Λακτοϋπεροξειδάση | 0,5% | Αναστέλλει την αύξηση των βακτηρίων |
| BSA | 5-10% | Μεγάλη πρωτεΐνη, πηγή απαραίτητων αα |
| γλυκομακροπεπτίδιο | 10-15% | Πηγή διακλαδισμένων αα αλλά δεν περιέχει αρωματικά αα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη) |

Πίνακας 3: Συστατικά τυρογάλακτος

Συνολικά, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα. Επίσης παρουσιάζουν καλύτερη απορρόφηση και χρήση από

τον οργανισμό συγκριτικά με διαλύματα αμινοξέων (Daenzer et al, 2001). Ακόμα, έχουν μεγάλες ποσότητες αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα (λευκίνη, βαλίνη, ισολευκίνη) τα οποία -ιδιαίτερα η λευκίνη- σχετίζονται με την επιδιόρθωση και αύξηση ιστών. Η λευκίνη έχει αναγνωριστεί ως το αμινοξύ-κλειδί κατά τη διαδικασία έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Anthony et al, 2001). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και μεθειονίνη, που μετατρέπονται ενδοκυτταρικά σε γλουταθειόνη.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος:

1. Η λακτοφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 689αα που δεσμεύει σίδηρο και πρόκειται για μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό.

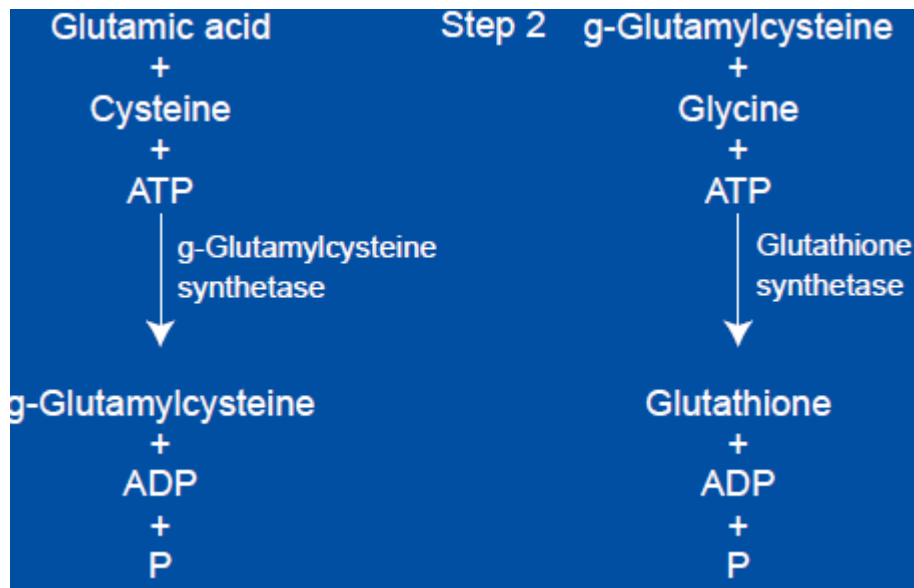
2. Οι ανοσοσφαιρίνες που περιέχονται στο τυρόγαλα μπορούν να προσδώσουν ανοσία στον άνθρωπο απέναντι σε ροταϊούς καθώς και σε βακτήρια όπως *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, και *Shigella flexneri*.

3. Η β-λακτοσφαιρίνη που είναι και η κύρια πρωτεΐνη του τυρογάλακτος εκτός από πηγή απαραίτητων αμινοξέων, έχει και μια δομική περιοχή που μεταφέρει ρετινοειδή, έχοντας έτσι την ικανότητα να ρυθμίζει τη δράση λεμφοκυττάρων (Guimont et al, 1997).

4. Η α-λακταλβουμίνη εκτός από πηγή απαραίτητων και διακλαδισμένων αμινοξέων έχει δείξει ότι επάγει την απόκριση των Β-λεμφοκυττάρων σε αντιγόνα

5. Το γλυκομακροπεπτίδιο προκύπτει από την επεξεργασία της καζεΐνης με χυμοσίνη. Είναι πλούσιο σε διακλαδισμένα αμινοξέα ενώ δεν περιέχει κανένα αρωματικό αμινοξύ. Έτσι η έλλειψη φαινυλαλανίνης το καθιστά ιδανικό για διατροφή ατόμων με φαινυλκαϊτονουρία.

Ως προς τον μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος, φαίνεται ότι οφείλεται κυρίως στη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε κυστεΐνη η οποία χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για την παραγωγή γλουταθειόνης σύμφωνα με το παρακάτω μονοπάτι:



Εικόνα 11: Βιοσύνθεση γλουταθειόνης

Συνεχίζοντας, η λακτοφερίνη, σύμφωνα με μελέτες 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⁻ βακτηρίων (Tomita et al, 2002). Επιπλέον, η λακτοφερίνη μειώνει τα επίπεδα TNF και IL-6 μειώνοντας έτσι τη φλεγμονή.

Η α-λακταλβουμίνη έχει τη δυνατότητα δέσμευσης σε βαρέα μέταλλα (Sandberg et al, 1999) ενώ ταυτόχρονα μειώνει το οξειδωτικό στρες καθώς δεσμεύει τον σίδηρο (Ha & Zemel, 2003)

Σχετικά πρόσφατα, το τυρόγαλο χαρακτηρίστηκε ως διατροφικό συμπλήρωμα για τη μείωση της πίεσης του αίματος. Έχουν απομονωθεί αντιυπερτασικά πεπτίδια από την β-λακτοσφαιρίνη που είχαν τη δυνατότητα αναστολής του ACE (μετατρέπει την αγγιοτενσίνη I σε αγγιοτενσίνη II) εμποδίζοντας έτσι τη συστολή των αγγείων με αποτέλεσμα τη μείωση της πίεσης (Pihlanto-Leppala et al, 2000). Κλείνοντας, η β-λακτοσφαιρίνη, φάνηκε να μειώνει τη χοληστερόλη, εμποδίζοντας την απορρόφηση της στα μικκύλια του εντέρου (Nagaoka, 1996).

2.6.1 Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος

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

Το γάλα παστεριώνεται σε υψηλή θερμοκρασία για μικρή χρονική περίοδο (72°C,30s) και διατηρείται όλη τη νύχτα στους 40°C. Έπειτα 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. Στη συνέχεια, προστίθεται το εκχύλισμα πυτιάς και το μίγμα αναδεύεται έως ότου πήξει.

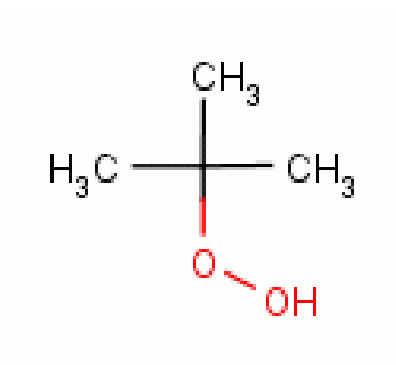
Η πυτιά προέρχεται από τον τέταρτο στόμαχο των νεογέννητων μοσχαριών. Η χυμοσίνη, που αποτελεί το ενεργό ένζυμο της πυτιάς, βοηθά στο πήξιμο του γάλακτος διαχωρίζοντας το σε πηγμένο γάλα για τυρί και σε ορό γάλακτος. Στα νεογέννητα μοσχάρια, η χυμοσίνη βοηθά στη χώνευση και στην απορρόφηση του γάλακτος, ωστόσο, οι ενήλικες αγελάδες δεν έχουν αυτό το ένζυμο.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή στραγγίζεται διαμέσου κοσκίνων από ανοξείδωτο ατσάλι και 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 συμπύκνωμα του ορού γάλακτος το οποίο περιέχει περίπου 80% πρωτεΐνη. Το συμπύκνωμα μπορεί έπειτα να μικροδιηθηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να φτάσει το 95%.

Το τελικό συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος θερμαίνεται και ξηραίνεται με ψεκασμό έτσι ώστε να προκύψει η σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Με τη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να αφαιρεθεί η λακτόζη και τα λίπη από το συμπύκνωμα. 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.

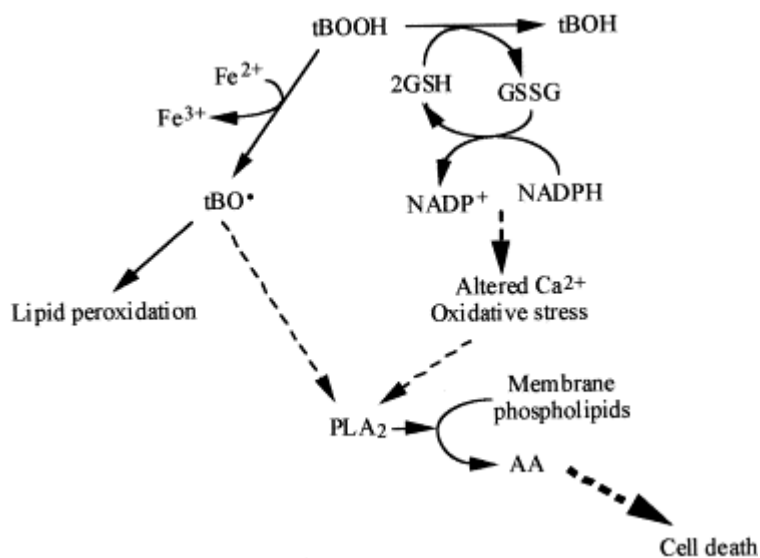
2.7 tert- Βούτυλο υδροϋπεροξειδίο (t-BOOH)

Το tert-Βούτυλο υδροϋπεροξειδίο είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ώστε να προκαλέσει οξειδωτικό στρες στους μυοβλάστες.



Εικόνα 12: Δομή του t-BOOH

Το t-BOOH χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του t-BOOH που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 13. Έχει παρατηρηθεί ότι το t-BOOH οξειδώνει την GSH, μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Sies and Summer, 1975; Lima et al., 2006). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών tBO^{\bullet} (Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες tBO^{\bullet} (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του t-BOOH με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξείδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Latour et al., 1995).



Εικόνα 13: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του t-BOOH

3. Σκοπός

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

4. Υλικά και μεθόδους

4.1. Υλικά

4.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

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

4.1.2. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

- i. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων C2C12 είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:
 - ✓ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gilbo BRL 41966)
 - ✓ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
 - ✓ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
 - ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα:

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

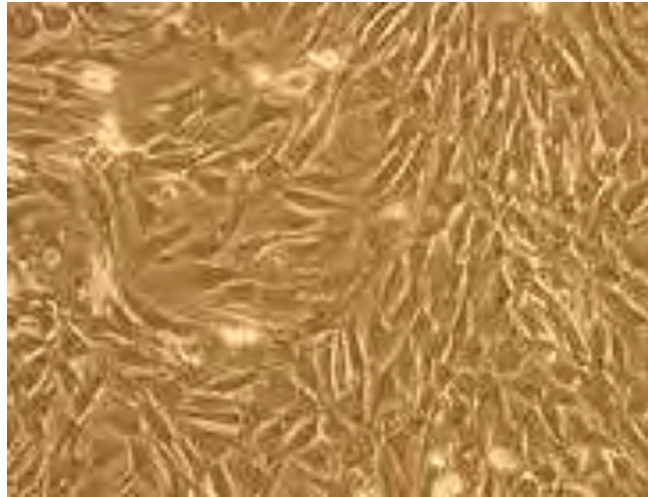
β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

- ii. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)
- iii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- iv. Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- v. Χρωστική DCF (Sigma)
- vi. FACS Clean (Becton-Dickinson)
- vii. FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- viii. FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- ix. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

4.1.3 Μυϊκά κύτταρα C2C12

Τα μυϊκά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ επιμύων μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. 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). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 14: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

4.2. Μέθοδοι

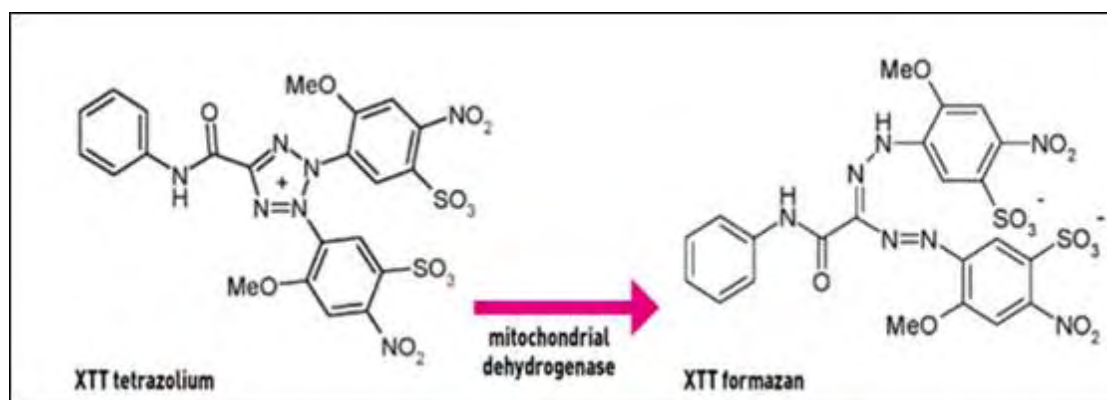
4.2.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)

Οι μυοβλάστες αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

4.2.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο XTT

4.2.2.α. Αρχή μεθόδου

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



Εικόνα 15: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

4.2.2.β. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθονταν 5000 κύτταρα/θέση σε ένα «πίατο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της πρωτεΐνης έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της πρωτεΐνης στην κυτταρική αύξηση των μυοβλαστών C2C12 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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



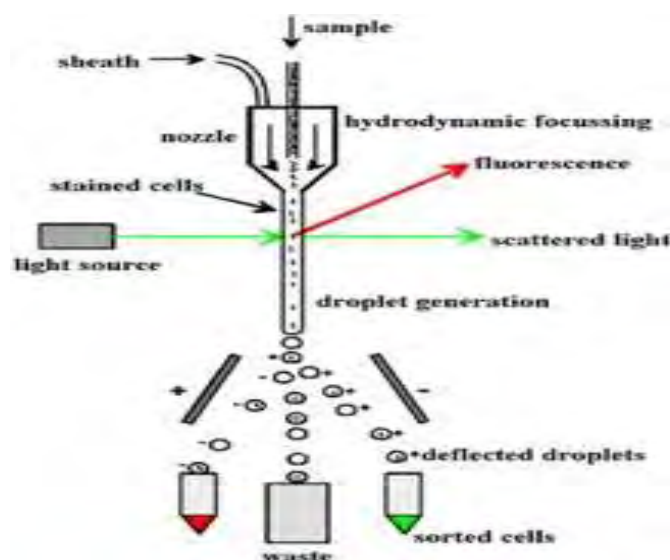
Εικόνα 16: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer

β) 96-well plate

4.2.3 Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως

άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 17. Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδους) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της

προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

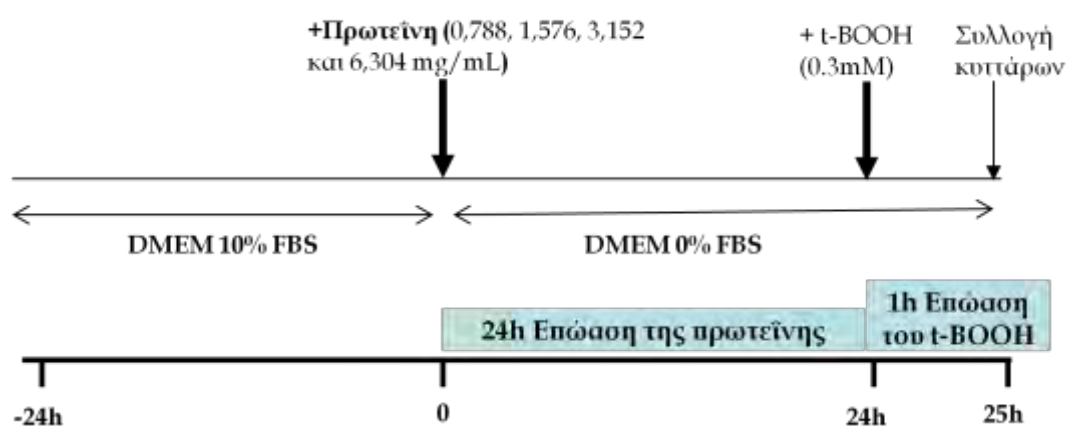


Εικόνα 18: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

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

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 19. Τα κύτταρα επωάζονται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (5 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και η πρωτεΐνη (500 μL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού FBS(4,5 ml) με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH (500μL) για 1 h. Χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με την πρωτεΐνη και τον t-BOOH και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

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



Εικόνα 19: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στη γλουταθειόνη, τις ελεύθερες ρίζες και τα TBARS στα κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της πρωτεΐνης και του t-BOOH. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

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

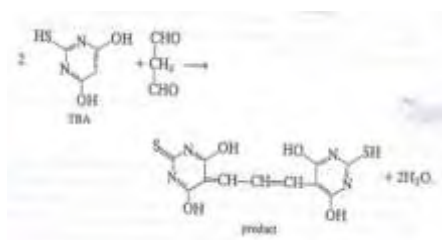
4.2.5.β. Πειραματική διαδικασία

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

4.2.6 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

4.2.6.α. Αρχή μεθόδου

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



Εικόνα 20: Αντίδραση του TBA με την MDA

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεύδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

4.2.6.β. Πειραματική διαδικασία

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

Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

4.2.6.γ. Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

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

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

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

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

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

4.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

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

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα

συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H_2O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

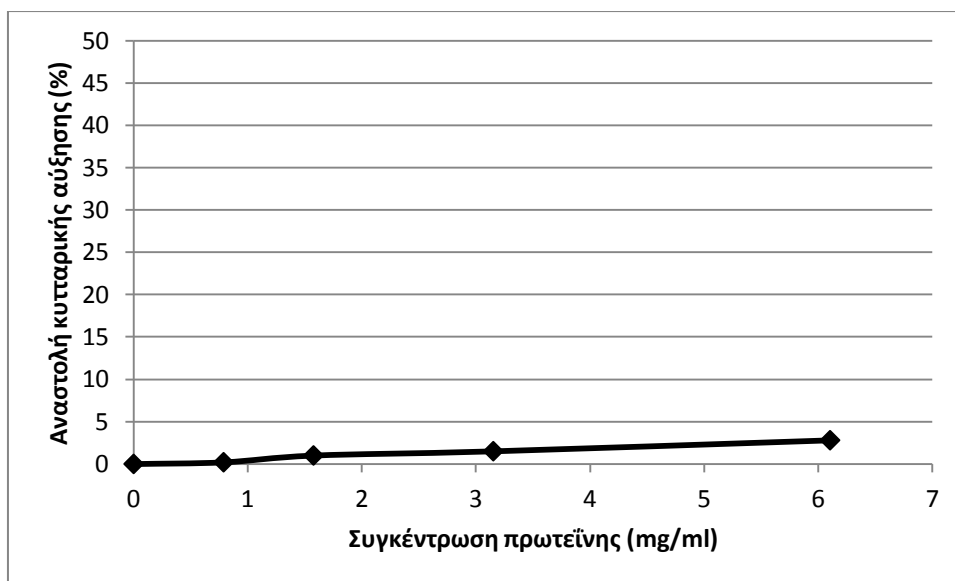
4.2.8 Στατιστική ανάλυση

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

5. Αποτελέσματα

5.1 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ.

Η πρωτεΐνη δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στους μυοβλάστες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml).



Γράφημα 1: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των C2C12 κυττάρων από την πρωτεΐνη τυρογάλακτος

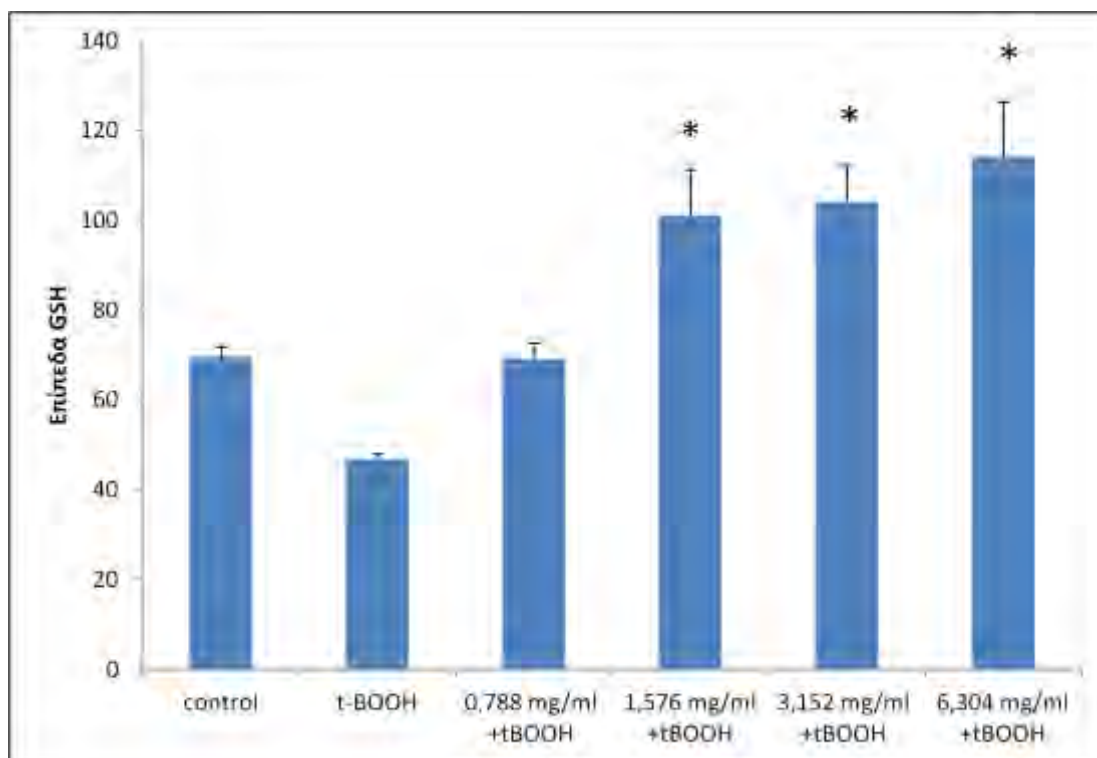
5.2 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στους μυοβλάστες C2C12 έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 30 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

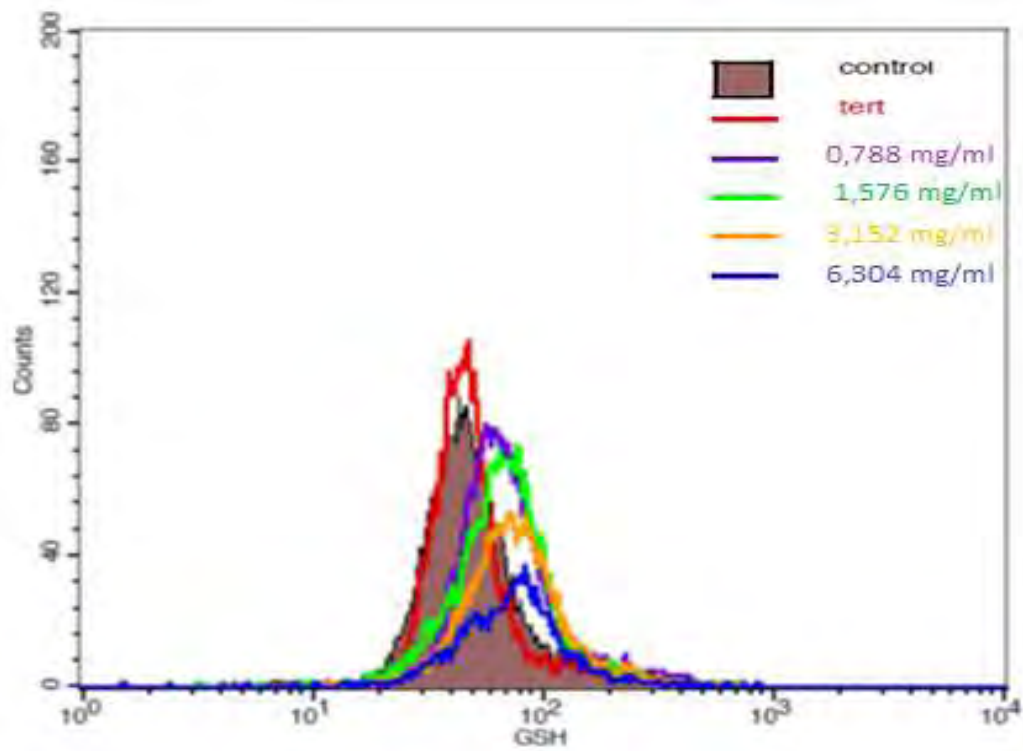
Όπως φαίνεται στο γράφημα 2 τα επίπεδα της γλουταθειόνης μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα μειώθηκαν κατά 32,6 % σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 47,6%, 115,7%, 122% και 143,7%, σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml αντίστοιχα.

Στο γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής.

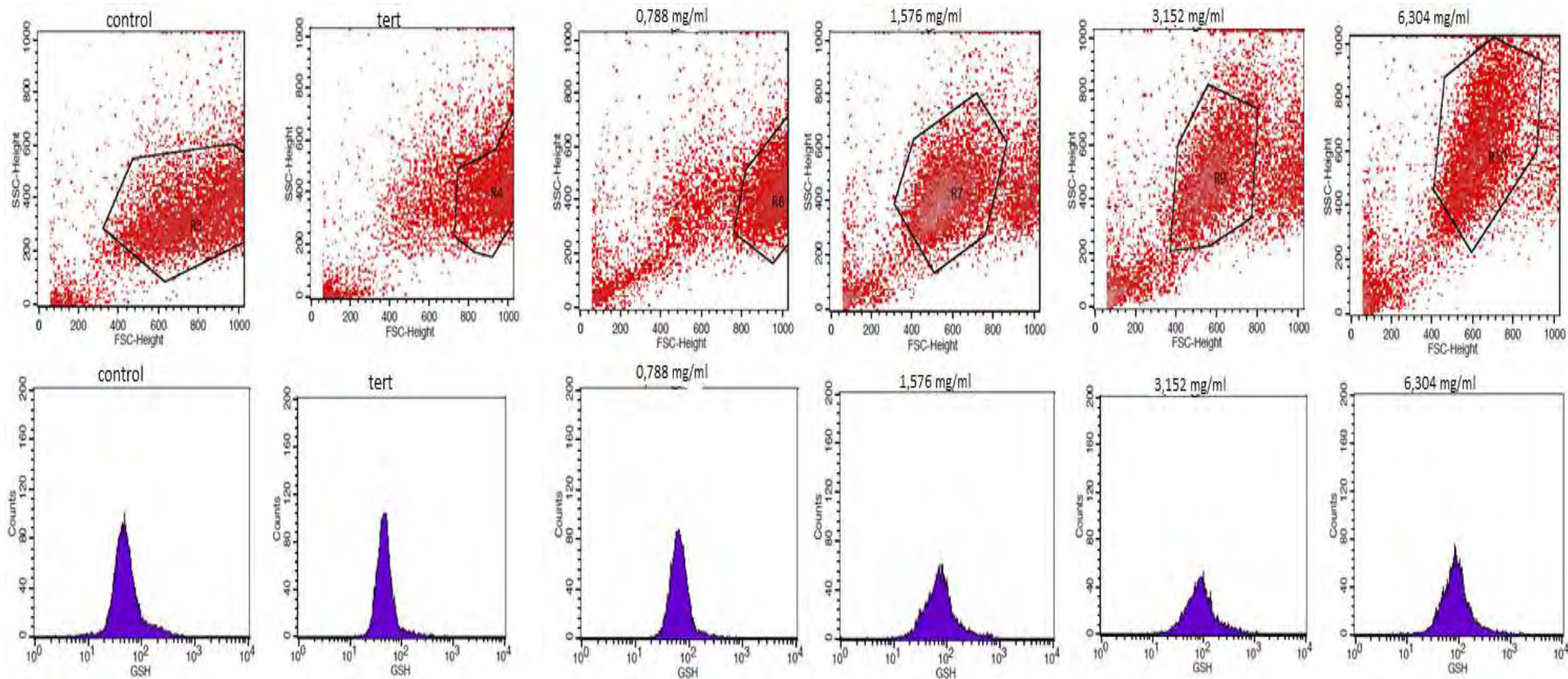
Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης τυρογάλακτος, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.



Γράφημα 2: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0.05$).



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



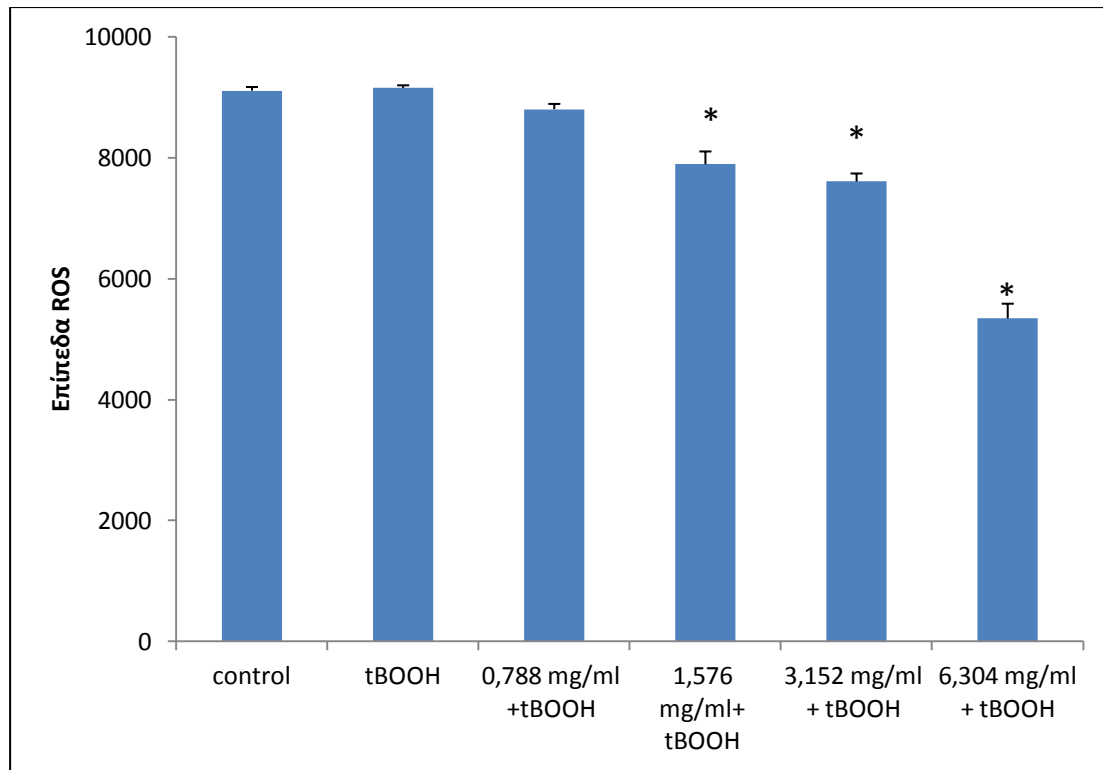
Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BOOH

5.3 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

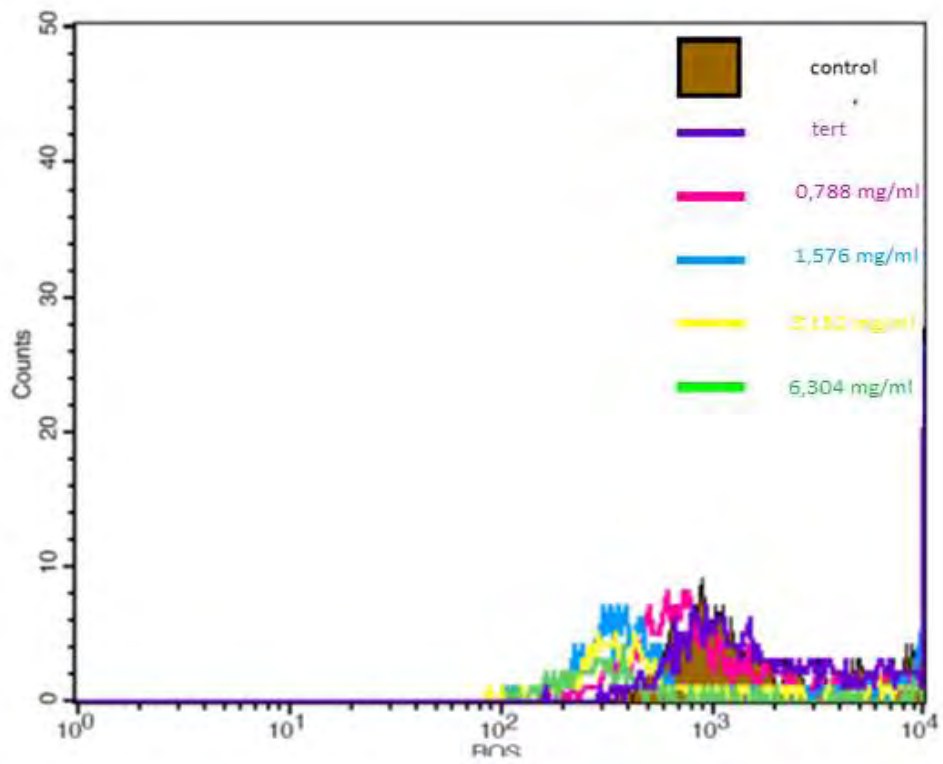
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στους μυοβλάστες C2C12 έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 30 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5 τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα δεν επηρεάστηκαν σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ROS κατά 3,4 %, 13,4%, 16,5% και 41,4% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml αντίστοιχα.

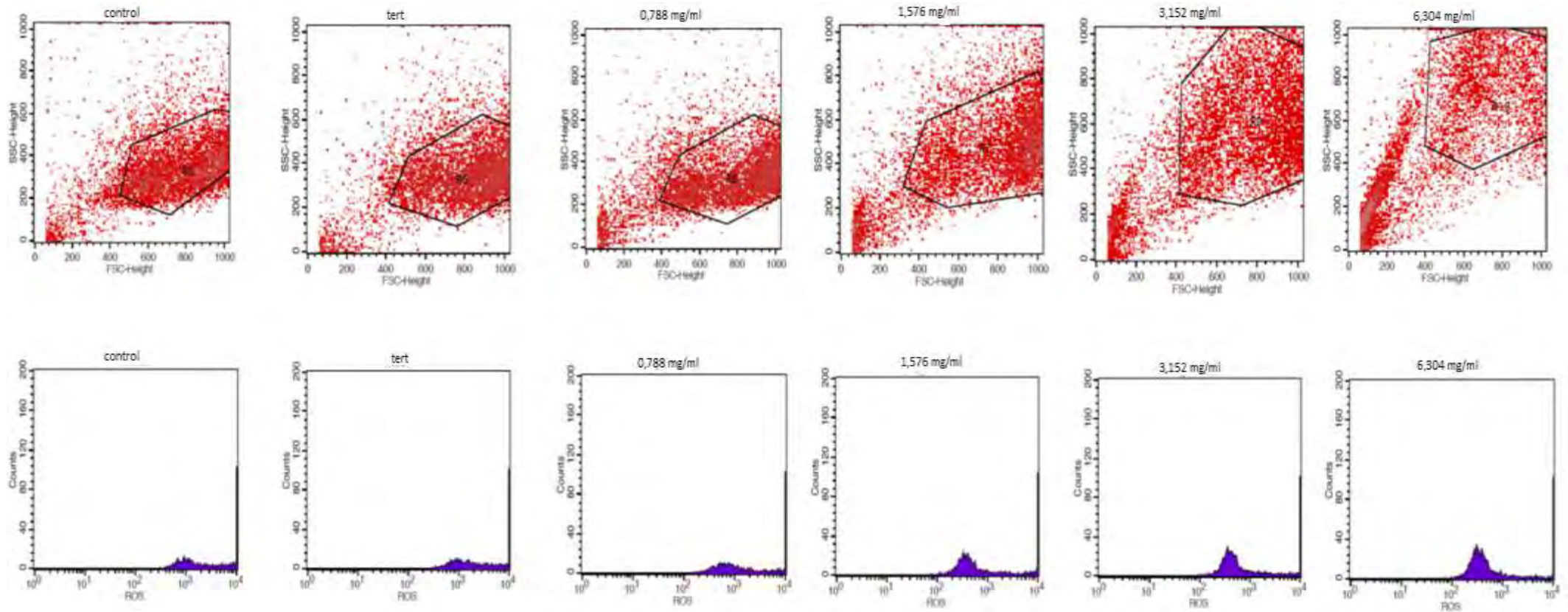
Στο γράφημα 6 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης τυρογάλακτος. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα αριστερά. Αυτό υποδηλώνει μειωμένα επίπεδα ROS.



Γράφημα 5: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH (P<0.05).



Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

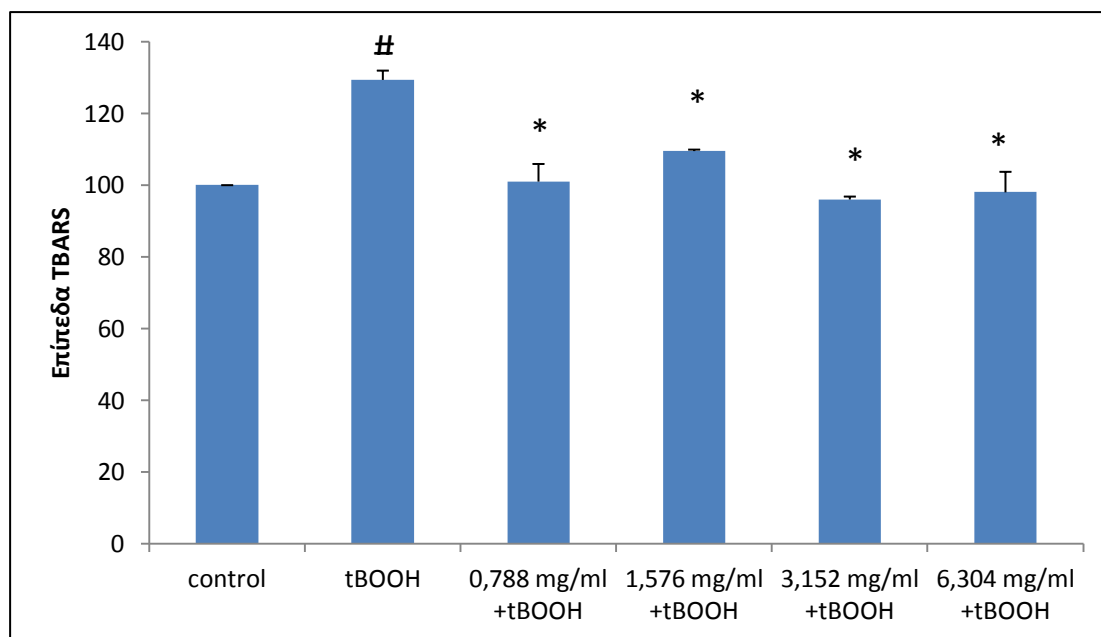


Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης πρωτεΐνης τυρογάλακτος και t-BOOH.

5.4 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

Ο προσδιορισμός των TBARS έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα C2C12 επωάστηκαν με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 30 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα των TBARS υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 8 τα επίπεδα των TBARS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα αυξήθηκαν κατά 29% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα TBARS κατά 21,7%, 15%, 25,5% και 24% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml αντίστοιχα.



Γράφημα 8: Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control.* Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH (P<0.05).

6. Συζήτηση

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών ουσιών όπως οι ελεύθερες ρίζες και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός κυττάρου με αποτέλεσμα να υπάρχουν περισσότερα οξειδωτικά μόρια απ' όσα μπορεί να εξουδετερώσει το κύτταρο. Αυτό οδηγεί σε καταστροφή ή αλλοίωση των πυρηνόφιλων μακρομορίων καθώς οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλες και αλληλεπιδρούν με αυτά.

Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί λιπιδική υπεροξειδωση όπου τα λιπίδια μετατρέπονται σε μηλονική διαλδεΰδη (MDA) με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η διαπερατότητα και η δομή των μεμβρανών γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του κυττάρου λόγω απελευθέρωσης υδρολυτικών ενζύμων από τα λυσοσώματα, παύση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια (είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη δομή της μεμβράνης του οργανιδίου), ρήξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης κ.α.

Επίσης μπορούν να οξειδωθούν και οι πρωτεΐνες, οδηγώντας σε παραγωγή καρβονυλίων, με αποτέλεσμα να χάνουν τη δραστηρότητά τους.

Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA προκαλώντας μεταλλάξεις οι οποίες αν είναι εκτεταμένες οδηγούν σε θάνατο, αλλιώς μπορούν να συσσωρευτούν και να προκαλέσουν εξαλλαγή του κυττάρου σε καρκινικό (σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες όπως οι προαγωγείς της κυτταρικής διαίρεσης).

Γενικά, το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις (παρόλο που οι ελεύθερες ρίζες κρίνονται απαραίτητες σε χαμηλά επίπεδα για την ορθή λειτουργία του οργανισμού, πχ λειτουργία ανοσοποιητικού, μεταγωγή σήματος). Επομένως, αν ένα σκεύασμα έχει την ικανότητα να μειώνει τα επίπεδά των ελευθέρων ριζών, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη αρκετών παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Έτσι, ελέγξαμε την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη του τυρογάλακτος σε μυοβλάστες ποντικού (σειρά C2C12). Ο λόγος που επιλέχθηκαν οι μυοβλάστες είναι ότι κατά την άσκηση παρατηρείται σημαντική παραγωγή ελευθέρων ριζών στους μύες και θελήσαμε να προσομοιώσουμε τα αποτελέσματα της άσκησης μέσω του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH για να δούμε αν η επώαση των κυττάρων με την πρωτεΐνη είχε

ευεργετικές ιδιότητες ως προς τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH), ελευθέρων ριζών (ROS) και λιπιδικής υπεροξειδωσης. Ο Davies et al. (1982) ήταν ο πρώτος που έδειξε ότι η άσκηση αυξάνει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Από τότε, πολλές μελέτες αποκάλυψαν τις επιδράσεις της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Οι περισσότερες από αυτές περιελάμβαναν αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία και κολύμβηση) (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 2000; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al., 1998; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένο VO_2 , γεγονός το οποίο ίσως αυξάνει την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών. Επομένως, πολλές μελέτες έδειξαν ότι τέτοια φυσική δραστηριότητα προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών και στα ζώα και στους ανθρώπους. (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 2000; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Child et al., 1998; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005; Vider et al., 2001).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πήραμε από τα πειράματα μπορούμε να πούμε πως η πρωτεΐνη εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες που προστατεύουν τα κύτταρα από τις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Λόγω αυτής της δραστηριότητας της, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας χρήσιμος αντιοξειδωτικός παράγοντας.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT έδειξαν πως η πρωτεΐνη δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση, τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες (0,788, 1,576, 3,152 και 6,304 mg/ml).

Όσον αφορά τα επίπεδα γλουταθειόνης, που μετρήθηκαν με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου, τα κύτταρα έπειτα από επώαση μόνο με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH εμφάνισαν πτώση κατά 32,6% σε σχέση με το control, ενώ αυτά που είχαν επωαστεί και με πρωτεΐνη είχαν υψηλότερα επίπεδα. Αναλυτικότερα, στα κύτταρα όπου χρησιμοποιήθηκαν 0,788mg/ml πρωτεΐνης είχαμε αύξηση κατά 47,6% σε σχέση με το t-BOOH ενώ συγκριτικά με το control ήταν στα ίδια επίπεδα. Στην αμέσως επόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης (1,576mg/ml) είχαμε αύξηση κατά 115,7% σε σχέση με το t-BOOH ενώ συγκριτικά με το control ήταν κατά 45%. Στα 3,152mg/ml πρωτεΐνης είχαμε αύξηση κατά 122% σε σχέση με το t-BOOH ενώ συγκριτικά με το control κατά 49,6%. Τελειώνοντας με τη γλουταθειόνη, στα 6,304mg/ml πρωτεΐνης είχαμε αύξηση κατά 143,7% σε σχέση με το t-BOOH ενώ συγκριτικά με το control κατά 64%. Όπως βλέπουμε, τα επίπεδα γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά έπειτα από επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος καθώς με εξαίρεση την μικρότερη

συγκέντρωση (0,788mg/ml) οι υπόλοιπες είχαν σαν αποτέλεσμα τα επίπεδα GSH να υπερβούν και αυτά του control.

Η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Xu et al., 2011 βρέθηκε ότι στην ίδια κυτταρική σειρά με τη δική μας (C2C12) υπό την επίδραση διαφορετικού οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), η επώαση με 0,5mg/ml πρωτεΐνης τυρογάλακτος (80,5% περιεκτικότητα) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης κατά 70%. Σε μια άλλη έρευνα από τους Yang-Ming Tseng et al., 2006, βρέθηκε ότι η επώαση με πρωτεΐνη ορού του γάλακτος (90% περιεκτικότητα) αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά PC12 (προέρχονται από μυελό επινεφριδίων ποντικού) έπειτα από επαγωγή οξειδωτικού στρες από αιθανόλη κατά 22% για συγκέντρωση πρωτεΐνης 1mg/ml και κατά 73,8% για συγκέντρωση 10mg/ml. Ακόμα, μια έρευνα των Kent et al., 2003 έδειξε ότι η υδρολυμένη πρωτεΐνη (90,5% περιεκτικότητα) συγκέντρωσης 0,5mg/ml προκάλεσε αύξηση της γλουταθειόνης κατά 64% σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προστάτη.

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

Στα ROS που επίσης προσδιορίστηκαν με κυτταρόμετρο, η επώαση με το t-BOOH δεν φάνηκε να έχει επίδραση καθώς τα επίπεδά τους παρέμειναν ίδια με αυτά του control. Αυτό ίσως οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που

παράγει το t-BOOH από τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης που περιέχεται στα κύτταρα. Η επώαση με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των ROS.

Αναλυτικότερα, στα κύτταρα όπου χρησιμοποιήθηκαν 0,788mg/ml πρωτεΐνης είχαμε μείωση κατά 3,4% σε σχέση με το control. Στην αμέσως επόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης (1,576mg/ml) είχαμε μείωση κατά 13,4% σε σχέση με το control. Στα 3,152 mg/ml πρωτεΐνης είχαμε μείωση κατά 16,5% ενώ στα 6,304mg/ml πρωτεΐνης είχαμε μείωση κατά 41,4% σε σχέση με το control.

Βλέπουμε λοιπόν μια μείωση στα επίπεδα των ROS συγκριτικά με αυτά που έχουν τα κύτταρα από μόνα τους που φτάνει μέχρι και 41,4% στην υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Αυτή η πτώση πιθανώς οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή γλουταθειόνης από τα κύτταρα λόγω της πρωτεΐνης, η οποία εξουδετερώνει τις ήδη υπάρχουσες ρίζες. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς την επίδραση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα των ROS σε κυτταρικές σειρές.

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη των επιπέδων GSH και ROS, παρατηρήσαμε (γραφήματα 4 και 7) ότι η επώαση με την πρωτεΐνη προκαλεί μεταβολή στον πληθυσμό, αυξάνοντας τόσο το μέγεθος όσο και την κοκκίωση του. Αυτή η μεταβολή οφείλεται πιθανώς στην είσοδο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος εντός των κυττάρων.

Κλείνοντας με τη συζήτηση των αποτελεσμάτων θα αναφερθούμε στα TBARS. Πρόκειται για μια μέθοδο που ανιχνεύει φωτομετρικά τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) μέσω σύνδεσης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ κι έτσι μπορούν να προσδιοριστούν τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με t-BOOH είχαν σημαντικά αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση κατά 29% σε σχέση με το control. Αυτά που επώαστηκαν με 0,788mg/ml πρωτεΐνης παρουσίασαν μείωση κατά 21,7% σε σχέση με το t-BOOH. Στην επόμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης (1,576mg/ml) παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 15% σε σχέση με το t-BOOH. Στα 3,152mg/ml είχαμε μείωση κατά 25,5% σε σχέση με το t-BOOH. Τέλος, στα 6,304mg/ml παρατηρήθηκε μείωση κατά 24% σε σχέση με το t-BOOH. Τα επίπεδα των TBARS των δειγμάτων, όσον αφορά το control ήταν στα ίδια επίπεδα. Όλα τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το t-BOOH.

Γενικά, η πρωτεΐνη μας μείωσε τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης. Μείωση στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Xu et al, 2011 όπου η πρωτεΐνη μείωσε την MDA κατά 22,7%.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε πως το σύμπλεγμα πρωτεϊνών ορού του γάλακτος εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση που σχετίζεται κυρίως με την παροχή κυστεΐνης για παραγωγή γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γλουταθειόνη αυξάνεται σημαντικά ενώ παράλληλα έχουμε και μείωση των ROS και των TBARS, γεγονός που καθιστά την πρωτεΐνη ως ένα πιθανό αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα διατροφής που βοηθάει στην πρόληψη ή αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Ασφαλώς, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης καθώς έχει δειχθεί ότι αυξάνει τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sukkar & Bounous 2004). Ένα πιθανό μονοπάτι μέσω του οποίου μπορεί να ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση μπορεί να είναι μέσω του Nrf-2, του κύριου αντιοξειδωτικού μεταγραφικού παράγοντα που ελέγχει την έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων.

7.Βιβλιογραφία

1. Sebastian J. Padayatty, MRCP, PhD, Arie Katz, MD, Yaohui Wang, MD, Peter Eck, PhD, Oran Kwon, PhD, Je-Hyuk Lee, PhD, Shenglin Chen, PhD, Christopher Corpe, PhD, Anand Dutta, S, Sudhir K Dutta, MD, FACN and Mark Levine, MD, FACN. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr* February 2003 vol. 22 no. 1 18-35
2. Scholz RW. Graham KS. Gumpricht E. Reddy CC. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:514-7
3. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM., (1993), Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:7915–22
4. Barreiro Esther, Hussain Sabah N.A., (2010), Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 12, Number 3
5. Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.
6. Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, 41/12,1819-1828.
7. Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000
8. Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.
9. Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
10. Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
11. 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.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.

13. Halliwell B, Gutteridge JMC, “The antioxidants of human extracellular fluids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.
14. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
15. Sudgen Peter H., Clerck Angela, (2006), Oxidative stress and growth regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 8, Numbers 11 & 12
16. K.D. Kent, W.J. Harper, J.A. Bomser (2003). Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 17) 27–33
17. Regina Maria Vilela, Larry C. Lands, Hing M. Chan, Behnam Azadi and Stan Kubow. High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 1013 – 1029
18. Ryan J. Elias , Sarah S. Kellerby & Eric A. Decker(2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:430–441
19. Sukkar, Bounous (2004). The role of whey protein in antioxidant defense. *Rivista Italiana di Nutrizione Parenterale ed Enterale / Anno 22 n. 4*, pp. 193-200
20. Keri Marshall (2004). Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review*. Volume 9, Number 2
21. Yang-Ming Tseng , Shu-Kai Lin, Jen-Kuei Hsiao, Ing-Jun Chen, Jang-Hwa Lee, Szu-Hsien Wu, Li-Yu Tsai (2006). Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure. *Food and Chemical Toxicology* 44 574–578
22. Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
23. Von Sonntag C (1987). *The Chemical Basis of radiation Biology*. Taylor & Francis, London.

24. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-44790.
25. 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.
26. 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.
27. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM (1980). Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1159-1163.
28. Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
29. Ames BN (1999). Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. *Ann NY Acad Sci* 889: 87-106.
30. Beckman KB and Ames BN (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272: 19633-19636.
31. Bielski BHJ and Cabelli DE (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active Oxygen in Chemistry*.
32. Foole CS, Valentine JS, Greenber A, Liebman JF(eds). Chapman and Hall, London, pp.66-104.
33. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
34. Davis KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.
35. 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.
36. Downey JM (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52: 487-504.

37. 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.
38. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM et al (2002). Risk stratification for postoperative cardiovascular events via non-invasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002;105:1567-72.
39. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM et al (2003). Predictive value of non-invasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*;410:1769-75.
40. Grune T, Reinhecker T, Davies KJA (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEBJ* 11:526-534.
41. Halliwell B (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 72:1082-1087.
42. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
43. Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd ed.) Oxford: *Clarendon Press*, pp 136-158.
44. Hansford RG, Hogue BA and Mildaziene V (1997). Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr* 29: 89-95.
45. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K et al (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-8.
46. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300:156-166.
47. 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.
48. 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.

49. Levine RL and Stadtman ER (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol* 36: 1495-1502.
50. Lijinsky W (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443: 129-138.
51. Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U (2000). Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 17: 687-693
52. Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295-309.
53. 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.
54. 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.
55. Sheikholeslami Vatani D, Ahmadi Kani Golzar F(2012).Changes in antioxidant status and cardiovascular risk factors of overweight young men after six weeks supplementation of whey protein isolate and resistance training. *Appetite* Dec;59(3):673-8
56. Zhang QX, Ling YF, Sun Z, Zhang L, Yu HX, Kamau SM, Lu RR (2012). Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells.. *Biotechnol Lett*.
57. Kerasiotti E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis AM, Koutedakis Y, Stagos D, Kouretas D, Karathanos V. (2012) Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans.*Food Chem Toxicol*.
58. 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.
59. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2003;17:27-33

60. 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.
61. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001;131:856S-860S.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, and Guoyao Wu(2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002;18:872– 879
69. I Rahman, S K Biswas (2006).OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. *Elsevier*
70. TPA Devasagayam, JC Tilak, KK Bloor, Ketaki S Sane, Saroj S Ghaskadbi, RD Lele (2004).Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI VOL. 52 OCTOBER 2004*
71. Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84

72. Latour I., Demoulin J.B., Buc-Calderon P. 1995 Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters* 373: 299-302.
73. Alia M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. 2006 Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharm* 212: 110-118.
74. Hix S., Kadisiska M.B., Mason R.P., Augusto O. 2000 *In vivo* metabolism of *tert*-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol* 13: 1056-1064.
75. Lima C.F. 2006 Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79; 2056-2068.
76. Sies H., Summer K.H. 1975 Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur J Biochem* 57: 503-512.
77. Sen, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of glutathione. *Nutritional Biochemistry* 8, 660–672
78. Anderson, M.E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111112, 1–14.
79. Lu, S., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEBJournal* 13, 1169–1183.
80. Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27 (9–10), 922–935.
81. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-205.
82. Alessio HM (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-24.

83. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 22(3): 509-13.
84. Liu J, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 89(1): 21-8.
85. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31(7): 911-22.
86. Palmer FM, Nieman DC, Henson Da, et al (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary Ig A changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89: 100-7.
87. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 77(6): 498-502.
88. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL et al (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30(11):1603-7.
89. Lovlin R, Cottle W, Pyke I (1987). Are indices of radical damage related to exercise intensity? *Eur J Apl Physiol* 56: 313-6.
90. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1): 1-7.
91. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T et al (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology* 7:263-70.
92. Howard M. Shapiro, 2003. Practical Flow Cytometry, 4th Edition