

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, οξειδωμένης
γλουταθειόνης και πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε μυοβλάστες
ποντικού μετά από επίδραση πρωτεΐνης τυρογάλακτος**

**Determination of total antioxidant capacity, oxidized glutathione and
protein carbonyls in mouse myoblasts after whey protein**

ΤΣΕΤΣΕΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας-Τοξικολογίας 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, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

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 Εικόνων.....	6
Περιεχόμενα Πινάκων και Γραφημάτων.....	7
Περίληψη.....	8
Εισαγωγή.....	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	10
1.2 Πηγές Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	12
1.2.1 Ενδοκυτταρικές πηγές.....	12
1.2.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	12
1.2.1.β. Σύστημα Κυτοχρώματος P450.....	15
1.2.1.γ. Φαγοκυττάρωση.....	15
1.2.1.δ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.....	15
1.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων.....	16
1.2.2 Εξωκυτταρικές πηγές.....	16
1.3 Βιολογικά συστήματα που επηρεάζουν οι Ελεύθερες Ρίζες.....	16
1.3.1 Θετικές επιδράσεις.....	17
1.3.2 Επιβλαβείς επιδράσεις.....	17
1.3.2.α. Οξειδωτικές βλάβες στο DNA.....	18
1.3.2.β. Οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες.....	18
1.3.2.γ. Υπεροξειδωση λιπιδίων.....	19
1.4 Αντιοξειδωτικά και Αντιοξειδωτικά Ένζυμα.....	19
1.4.1 Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα.....	20
1.4.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα.....	21
1.5 Οξειδωτικό Στρες.....	24
Γενικά-Ορισμός.....	24
1.5.1. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες.....	26
1.5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες.....	27
1.6 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein).....	28
1.6.1 Διαδικασία παρασκευής πρωτεΐνης ορού γάλακτος.....	30
2. Σκοπός.....	31
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
3.1. Υλικά.....	31
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	31
3.1.2. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος.....	31

3.1.3 Μυϊκά κύτταρα C2C12	32
3.2. Μέθοδοι	33
3.2.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)	33
3.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες και της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH	34
3.2.3 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	35
3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	37
3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)	38
3.2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	40
3.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω αντιδραστηρίου Bradford	41
3.3 Στατιστική ανάλυση	42
4. Αποτελέσματα	42
4.1 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	43
4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	44
4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)	45
4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	46
5. Συζήτηση	47
Βιβλιογραφία	50

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μόρια

Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

Εικόνα 3: Τελική οξειδωση-Σύστημα μεταφοράς e^- -Χημειώσμων (Q=ουβικινόνη, C=κυτόχρωμα C)

Εικόνα 4: Οξειδωση υποξανθίνης και ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Εικόνα 5: Επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό

Εικόνα 6: Η δομή της γλουταθειόνης (GSH) (ανηγμένη μορφή). Πρόκειται για ένα απλό τριπεπτίδιο συνιστόμενο από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ (L-glutamate), L-κυστεΐνη (L-cysteine) και γλυκίνη (glycine)

Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εικόνα 8: Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Εικόνα 9: Βιοσύνθεση της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης

Εικόνα 10: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

Εικόνα 11: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα μυϊκά C2C12 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του t-BOOH. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

Εικόνα 12: Σχηματική παρουσίαση της αναγωγής του DPPH παρουσία H^+

Εικόνα 13: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Περιεχόμενα Πινάκων και Γραφημάτων

Πίνακας 1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου

Πίνακας 1.1.2: Δραστικές μορφές αζώτου

Πίνακας 3.1.2.1: Η σύσταση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας των κυττάρων C2C12

Πίνακας 3.1.2.2: Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Γράφημα 1: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

Γράφημα 2: Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

Γράφημα 3: Επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

Γράφημα 4: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίου στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

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 τυρογάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml) σε μυοβλάστες ποντικού (C2C12). Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων καθώς επίσης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε κύτταρα που επωάστηκαν 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 φασματοφωτομετρικά.

Τα επίπεδα της TAC στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν σημαντικά κατά 27.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της TAC κατά 11%, 19.5%, 37% και 37.5% σε σχέση με τα επίπεδα της TAC στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

Τα επίπεδα της GSH μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν κατά 21.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της GSH κατά 8.09%, 45%, 78.9% και 99% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

Τα επίπεδα της GSSG μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκαν κατά 11% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της GSSG κατά 10%, 22%, 30% και 31% σε σχέση με τα επίπεδα της GSSG στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκε σημαντικά κατά 45.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 0.99%, 36%, 51% και 14% σε σχέση με την συγκέντρωσή τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/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.

Abstract

Oxidative stress is a condition in which there is increased production of free radicals with concomitant impairment of antioxidant body mechanisms. Thus it was necessary to find new antioxidants that can be taken as a dietary supplement exerting a protective action.

For this reason, in this study we investigated the antioxidant properties of goat whey protein (0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg protein / ml) in mouse myoblasts (C2C12). Determined the reduced levels (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), protein carbonyls, as well as total antioxidant capacity (TAC) in cells incubated with 4 different protein concentrations for 24h, and then treated with the oxidizing agent is t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide) (0,3 mM) for 30 minutes. Measurements were made spectrophotometrically.

Levels of TAC in myoblasts C2C12 after administration of the oxidant t-BOOH factor decreased significantly by 27.7% compared to control while in the samples prior to administration of the whey protein observed increased levels of TAC 11%, 19.5%, 37% and 37.5% relative to the levels of the TAC in the sample was administered only t-BOOH, the concentrations 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg protein / ml, respectively.

The levels of GSH after administration of the oxidant t-BOOH factor decreased by 21.7% compared to control while in the samples prior to administration of the whey protein observed increased levels of GSH by 8.09%, 45%, 78.9% and 99% in compared with the levels of GSH in the sample granted only t-BOOH, the concentrations 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg protein / ml respectively.

The levels of GSSG after administration of the oxidizing agent t-BOOH increased by 11% compared to control while in the samples prior to administration of the whey protein observed decreased levels of GSSG by 10%, 22%, 30% and 31% compared with the levels of GSSG in the sample granted only t-BOOH, the concentrations 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg protein / ml respectively.

The concentration of protein carbonyls after administration of the oxidizing agent t-BOOH increased significantly by 45.7% compared to control while in the samples prior to administration of the whey protein observe reduction of the concentration of protein carbonyls by 0.99%, 36%, 51% and 14% relative to their concentration in the sample was administered only t-BOOH, the concentrations 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg protein / ml, respectively.

So the goat whey protein appears to have antioxidant activity, but further studies are needed to clarify the mechanism by which an this action.

Εισαγωγή

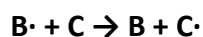
1.1 Ελεύθερες ρίζες

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 δραστηριότητά τους γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος.¹⁻²

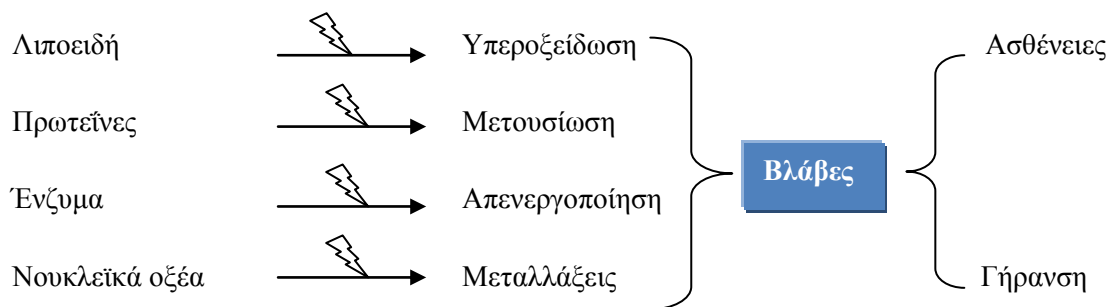
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της.



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 (Εικόνα 1).¹⁻²



Εικόνα 1: Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μόρια

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται γενικά ο όρος **δραστικές 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 ανιόντος του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), 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	
Ρίζες	Μη Ρίζες
Ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	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 1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου

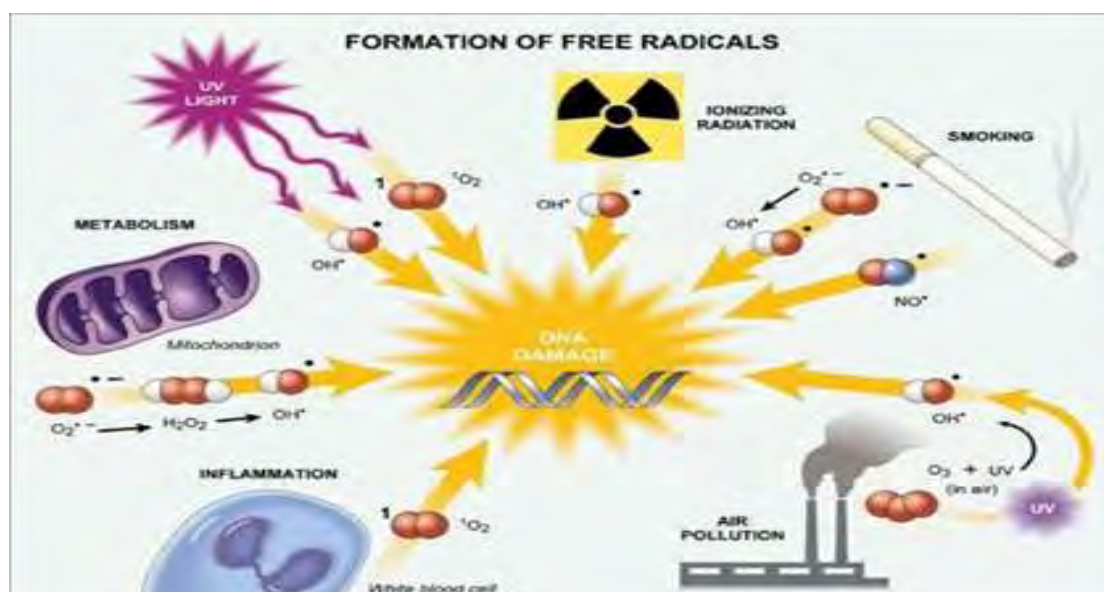
Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι **δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS)**. Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO^{\cdot} και το διοξείδιο του αζώτου NO_2^{\cdot} καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $ONOO^{\cdot}$).¹⁻³

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Ρίζες	Μη Ρίζες
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}\cdot$)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$)	Κατιόν Νιτροσουλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσουλίου (NO^-)

Πίνακας 1.1.2: Δραστικές μορφές αζώτου

1.2 Πηγές Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Διάφορες βιοχημικές διαδικασίες στα κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, υπάρχουν τόσο ενδοκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

1.2.1 Ενδοκυτταρικές πηγές

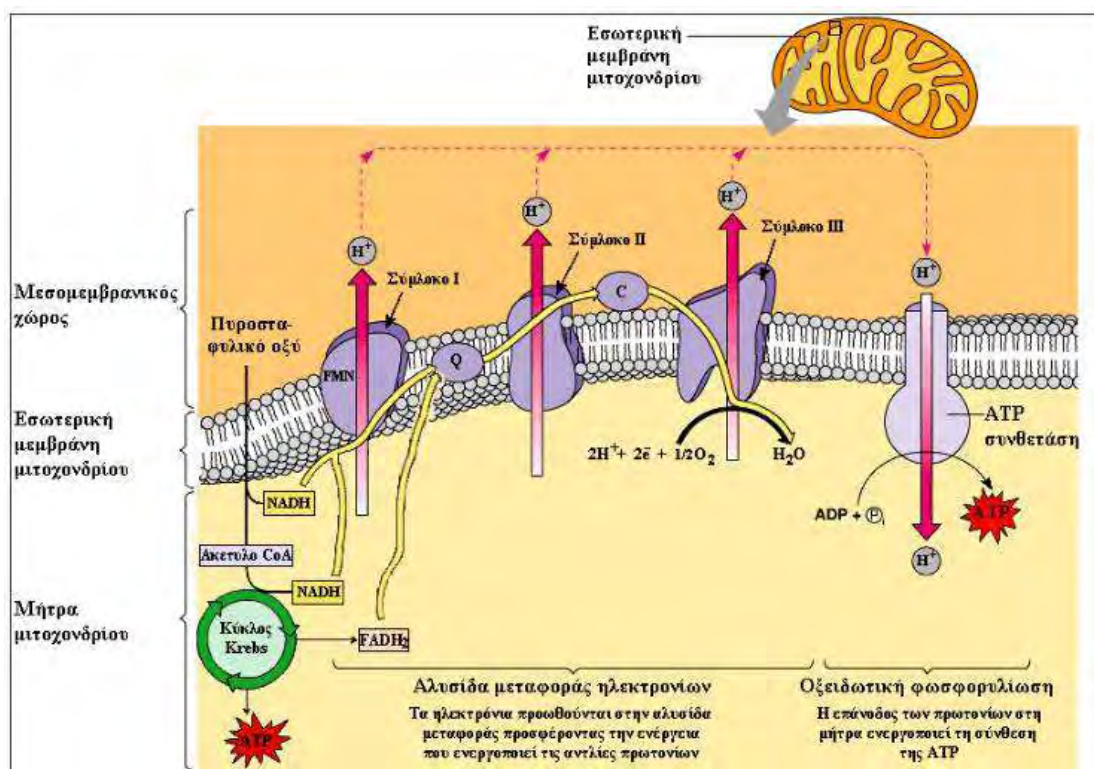
1.2.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διεργασία στην οποία παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH_2 προς το O_2 , διαμέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων και πιθανόν να αποτελεί την πιο σημαντική πηγή ROS στους αερόβιους οργανισμούς. Η μεταβολική αυτή πορεία αποτελεί την κυριότερη πηγή δημιουργίας ATP στους αερόβιους οργανισμούς. Μερικά χαρακτηριστικά αυτής της διεργασίας είναι:

- Η οξειδωτική φωσφορυλίωση γίνεται από αναπνευστικά συγκροτήματα που βρίσκονται μέσα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η πορεία της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, που δίνουν και τη μεγαλύτερη ποσότητα NADH και FADH₂ γίνονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (μήτρα). Πορείες που συνδέονται μεταξύ τους επιτελούνται σε γειτονικά διαμερίσματα του κυττάρου, έτσι ώστε να ελέγχονται άμεσα και αποτελεσματικά.
- Η οξείδωση του NADH αποδίδει 3 ATP, ενώ η οξείδωση του FADH₂ αποδίδει 2 ATP.
- Η μεταφορά ηλεκτρονίων από τα ανηγμένα συνένζυμα προς το O₂ (αναπνευστική αλυσίδα) και η φωσφορυλίωση του ADP για τη δημιουργία του ATP είναι πορείες συζευγμένες.

Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το FADH₂ στο O₂ μέσω μίας αλυσίδας τεσσάρων μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλοκών, τα οποία βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Εικόνα 3).⁴

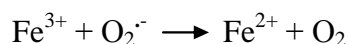
1. Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Ουβικινόνης (σύμπλοκο I)
2. Αναγωγή του ζεύγους Ηλεκτρικού-Ουβικινόνης (σύμπλοκο II)
3. Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Ουβικινόνης-Κυτοχρώματος C (σύμπλοκο III)
4. Οξειδάση του Κυτοχρώματος (σύμπλοκο IV)



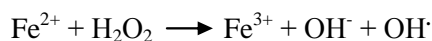
Εικόνα 3: Τελική οξειδωση-Σύστημα μεταφοράς e^- -Χημειώσωση (Q=ουβικινώνη, C=κυτόχρωμα C)

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλοκο 1) και το σύμπλοκο κυτοχρώματος bc1 (σύμπλοκο 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 . Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και $FADH_2$ στην ουβικινώνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$. Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .⁴

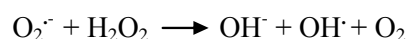
Πρώτη αντίδραση: το ανιόν του υπεροξειδίου του οξυγόνου ανάγει τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή.



Δεύτερη αντίδραση (αντίδραση Fenton): ο δισθενής σίδηρος αντιδρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου προς ρίζα υδροξυλίου και ανιόν υδροξυλίου



Τελική αντίδραση Haber - Weiss: άθροισμα της πρώτης και δεύτερης αντίδρασης.



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH

παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH· και NO₂·.

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH₂) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής υπεροξειδίου (O₂^{·-}).⁵⁻⁶

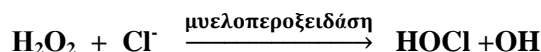
1.2.1.β. Σύστημα Κυτοχρώματος P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀. Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας O₂^{·-} το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂. Ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας O₂^{·-}.^{2,5,7}

1.2.1.γ. Φαγοκυττάρωση

Τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς ή τμήματά τους. Για την αναγνώριση των στόχων τους, θα πρέπει να επικαλύπτονται με οψώνια – μία διαδικασία που είναι γνωστή ως αντισωματικός οψωνισμός. Μπορούν να εσωτερικεύουν και να σκοτώνουν πολλά μικρόβια και κάθε φαγοκυτταρική διεργασία οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαγοσώματος στο οποίο εκκρίνονται δραστικά είδη οξυγόνου και υδρολυτικά ένζυμα. Η κατανάλωση του οξυγόνου κατά την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου έχει ονομαστεί «αναπνευστική έκρηξη», αν και δεν σχετίζονται με την αναπνοή ή την παραγωγή ενέργειας.

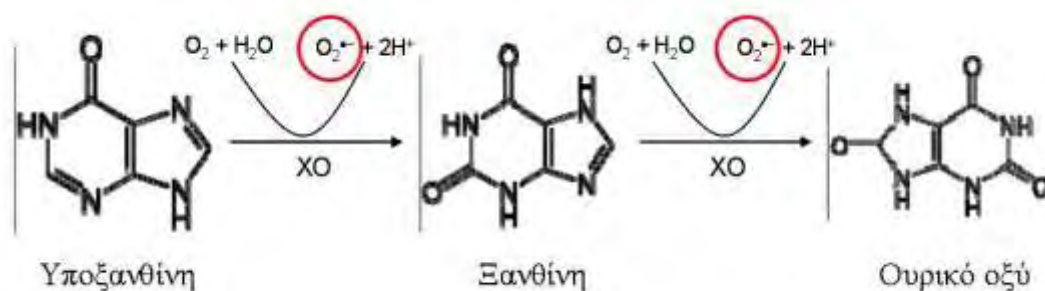
Η αναπνευστική έκρηξη περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου οξειδάση NADPH, το οποίο παράγει μεγάλες ποσότητες του υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο αντιδρά με ένα μόριο μέσω κατάλυσης ενζύμων γνωστό ως SOD (superoxide dismutases -Cu/ZnSOD και MnSOD) δίνοντας δύο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε υπερχλωρικό οξύ (HClO) από το πράσινο ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση της αίμης.⁸⁻¹⁰



1.2.1.δ. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Καταλύει την οξείδωση τόσο της υποξανθίνης όσο και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με ταυτόχρονη αναγωγή του O₂ σε O₂^{·-} και H₂O₂ (Εικόνα

4) σε περιπτώσεις όπως τραυματισμού των ιστών ή άλλων, όπου είναι δυνατόν να προκαλείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση της ξανθίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία $O_2^{\cdot-}$.¹¹⁻¹²



Εικόνα 4: Οξείδωση υποξανθίνης και ξανθίνης σε ουρικό οξύ

1.2.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων

Πολλά μόρια όπως οι τετραυδροπτερίνες, ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη, οι ορμόνες αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και L-DOPA (διδυδροξυφαινυλαλανίνη), θειόλες, ανηγμένες φλαβοενώσεις ($FMNH_2$ και $FADH_2$) και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν παρουσία O_2 σχηματίζοντας ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

1.2.2 Εξωκυτταρικές πηγές

Η υπεριώδης και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες.

Στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορούν να οδηγήσουν ορισμένα φάρμακα όπως επίσης τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς και το αλκοόλ. Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή.¹³⁻¹⁴

1.3 Βιολογικά συστήματα που επηρεάζουν οι Ελεύθερες Ρίζες

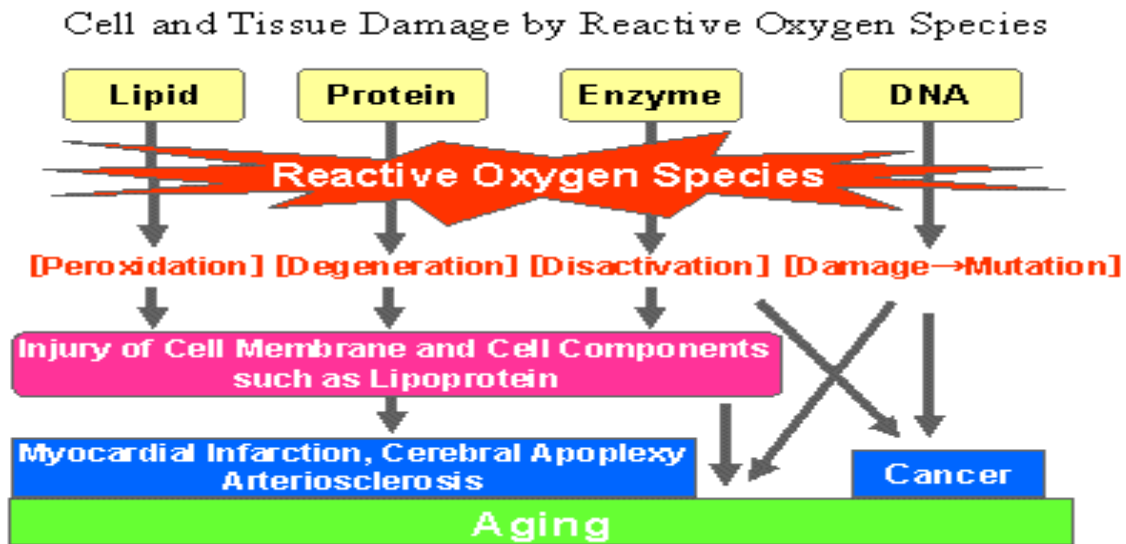
Ο ρόλος που κατέχουν οι ROS στη βιολογία του κυττάρου είναι διττός, διότι αφενός μεν μπορούν δυνητικά να αποτελούν τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού και αφετέρου να αποτελούν σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση.¹⁵

1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Οι ROS φαίνεται πως σχετίζονται με το σύστημα ανοσίας του οργανισμού, κυρίως δρώντας εναντίον των αντιγόνων κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, ένας ρόλος που αυξάνεται σημαντικά όταν λαμβάνει χώρα η φλεγμονή προκαλούμενη κυρίως από την έντονη άσκηση ή από τραυματισμούς λόγω έκκεντρης άσκησης. Οι ROS διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στην τροποποίηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Ακόμη διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην τροποποίηση 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), στην αποτοξίνωση του οργανισμού, διευκολύνοντας την αναπλήρωση του γλυκογόνου και στη μυϊκή συστολή όπου όταν αναστέλλεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται απώλεια της μυϊκής συστολής, ενώ αντίθετα όταν αυξάνεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται η εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση. 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 αγγειογένεσης.¹⁶⁻²²

1.3.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

Οι ROS σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προσβάλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως βάσεις DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, σάκχαρα και οργανικά οξέα (Εικόνα 5). Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό λαμβάνουν χώρα επειδή έχουν την ικανότητα να τροποποιούν το μέγεθος και το σχήμα των ενώσεων με τις οποίες έρχονται σε αλληλεπίδραση, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης των υγιών κυττάρων, να προκαλούνται καταστάσεις φλεγμονής και να αλλοιώνονται οι λειτουργίες του κυττάρου. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους, φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.



Εικόνα 5: Επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στον οργανισμό

1.3.2.α. Οξειδωτικές βλάβες στο DNA

Οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA περιλαμβάνουν βλάβες στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA ενώ αφορούν θραύσεις του, τροποποίηση βάσεων, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεσοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Παρόλο που το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA είναι συνεχές, οι τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν από τις ROS έχουν ως συνέπεια την οξείδωση του DNA που οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα πρόκλησης καρκίνου στον ανθρώπινο οργανισμό και γήρανσης των κυττάρων.²³⁻²⁶

1.3.2.β. Οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες

Οι οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες περιλαμβάνουν :

A) Σχηματισμό υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων και

B) Όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου

Βασικές βιοχημικές συνέπειες της οξείδωσης των πρωτεϊνών είναι η μείωση ή αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων, η απώλεια λειτουργικότητάς τους, η απώλεια ενεργότητας αναστολέων πρωτεασών, η συμπλοκοποίηση, η αυξημένη ή μειωμένη ευαισθησία σε πρωτεόλυση, η μη φυσιολογική πρόσληψη ουσιών από τα κύτταρα, η τροποποιημένη μεταγραφή γονιδίων και η αυξημένη ανοσογονικότητα.²⁶

1.3.2.γ. Υπεροξειδωση λιπιδίων

Από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών και των άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται στο κύτταρο είναι η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Το υδρόφοβο τμήμα των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων αποτελείται από λιπαρά οξέα με μακριές, αλειφατικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες, ένα μεγάλο ποσοστό των οποίων έχει έναν διπλό δεσμό (μονοακόρεστα λιπαρά οξέα) ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συνεισφέρουν σημαντικά στη ρευστότητα των μεμβρανών, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με όλες σχεδόν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Όμως, είναι πολύ ευάλωτα στην οξειδωτική προσβολή από διάφορα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου, με την οποία ξεκινά μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών, με κατάληξη την υπεροξειδωση λιπιδίων. 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.^{26,27}

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

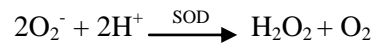
Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

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

1.4.1 Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα

α) Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

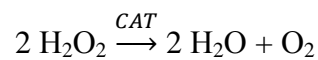
Η SOD εξαλείφει ταχύτατα τις ρίζες υπεροξειδίου από το κυτταρικό περιβάλλον μετατρέποντας τες σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, πριν αυτές προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και απαντάται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια. Το εν λόγω ένζυμο στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την παρουσία μαγγανίου, ενώ στο κυτταρόπλασμα απαιτεί την παρουσία ψευδαργύρου και χαλκού.²⁹

β) Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που σχετίζεται με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε εξειδικευμένα διαμερίσματα του οργανισμού, τα οποία ονομάζονται υπεροξεισώματα. Μικρές ποσότητες ενζύμου βρίσκονται, επίσης, στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στα μικροσώματα των κυττάρων. Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στην μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο και η δράση του εξαρτάται από την παρουσία του αιμικού σιδήρου.³⁰

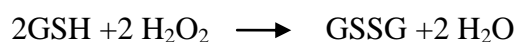


γ) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στο εξωτερικό του κυττάρου. Για την δράση του απαιτεί ως συμπράγοντα το ανόργανο συστατικό σελήνιο. Το εν λόγω ένζυμο ανάγει τα υδρουπεροξείδια (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) (μια αντίδραση που καταλύεται και από την μεταφορά της γλουταθειόνης) και επίσης μεταφέρει υδρογόνο στο υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να σχηματιστεί νερό, ενώ το ίδιο μετατρέπεται σε οξειδωμένη μορφή (GSSG). Για την πραγματοποίηση της τελευταίας αντίδρασης απαιτείται και το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη στην ανηγμένη του μορφή (GSH). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, δηλαδή, χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη.³¹⁻³²



ή



δ) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

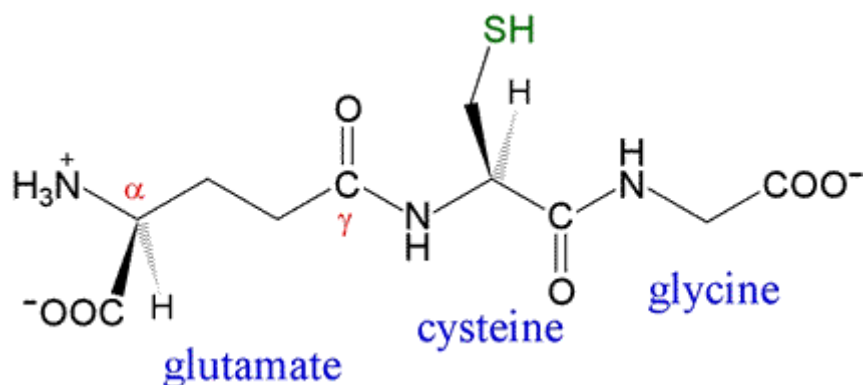
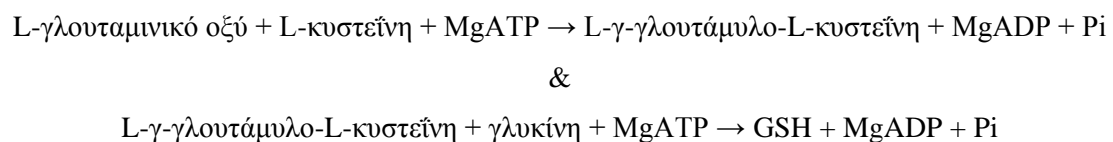
Η αναγωγή της γλουταθειόνης ανάγει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG → GSH) και συνεπώς καθίσταται υπεύθυνη για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.

1.4.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα

α) Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) (**Εικόνα 6**) συντίθεται από τρία αμινοξέα, L-γλουταμινικό οξύ (L-glutamate), L-κυστεΐνη (L-cysteine) και γλυκίνη (glycine) σε δύο διακριτά μεταξύ τους στάδια που καταλύονται από τα κατάλληλα ένζυμα. Βασικό συστατικό για την σύνθεση της αποτελεί η κυστεΐνη.³⁵ Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το μονοπάτι βιοσύνθεσής της παρουσιάζονται κάτωθι.



Εικόνα 6: Η δομή της γλουταθειόνης (GSH) (ανηγμένη μορφή). Πρόκειται για ένα απλό τριπεπτίδιο συνιστούμενο από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ (L-glutamate), L-κυστεΐνη (L-cysteine) και γλυκίνη (glycine).

Η GSH είναι ευρέως διαδεδομένη στους οργανισμούς και θεωρείται ως ο πλέον καθοριστικός ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης της ενεργής της θειολικής ομάδας.³⁶ Οι πιο σημαντικές δράσεις της είναι οι εξής:

- Εξουδετερώνει τη ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο.²⁶
- Ανάγει το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).³⁷
- Συμμετέχει στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε ορισμένα μεμβρανικά συστήματα.²⁶
- Εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες.
- Αποτελεί αποθήκη και μεταφορέα του NO και σχετίζεται με τη μεταφορά χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς το δεσμεύει και εμποδίζει ταυτόχρονα την αντίδρασή του με ελεύθερες ρίζες.²⁶
- Χρησιμεύει ως ραδιοπροστατευτικός παράγοντας.
- Συνιστά υπόστρωμα για διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως είναι οι υπεροξειδάσες και τρανσφεράσες της GSH αλλά και η αναγωγή της GSSG.²⁶
- Τέλος, η GSH εμπλέκεται στη νευροπροστατευτική δράση ενάντια σε πληθώρα ενδογενών και εξωγενών νευριτοξινών ενώ αλλαγές στο μεταβολισμό της έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες.³⁸⁻³⁹

β) Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C (AH₂) ή ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία μπορεί να δράσει με μεγάλη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα σε υδατικά διαλύματα όπως στο αίμα με τις ενεργές μορφές οξυγόνου, πριν την έναρξη της οξειδωτικής βλάβης των λιποειδών όπως των λιποπρωτεϊνών και των μεμβρανών.⁴⁰ Η βιταμίνη C αποτελεί συμπάρονα σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις και δότη ηλεκτρονίων με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, γεγονός που το καθιστά αντιοξειδωτικό με ισχυρή δράση. Η συγκεκριμένη βιταμίνη συμμετέχει σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό.

Συγκεκριμένα, μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες υδροξυλίου και αν παράγει νερό και τη μη δραστική ημι-δευδροασκορβική ρίζα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Επιπρόσθετα, η αναφερόμενη πρωτεΐνη μπορεί να συμμετάσχει στην εκκαθάριση των λιπούπεροξειδικών ριζών (LOO.) καθώς και στην εξουδετέρωση των ριζών ακλοξειδίου (RO.). Αξιοσημείωτος είναι και ο ρόλος της στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E), όπου μετατρέπεται η ίδια σε ρίζα (AH).⁴⁰⁻⁴²

γ) Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελεί την κύρια λιποδιαλυτή βιταμίνη και απαντάται είτε κοντά είτε μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες και τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων και ενώ η ίδια υπόκειται σε οξείδωση, παρεμποδίζει την οξείδωση και κατά συνέπεια την καταστροφή των λιπαρών οξέων. Η βιταμίνη E αντιδρά και με τις υδροξυλικές ρίζες αποδίδοντας το υδρογόνο της.⁴³⁻⁴⁴

δ) Καροτενοειδή

Το β-καροτένιο αποτελεί μια σημαντική προβιταμίνη A και οι αντιοξειδωτικές του ικανότητες αφορούν την δέσμευση και την απενεργοποίηση του μονήρους οξυγόνου και των ελευθέρων ριζών καθώς και την ικανότητα να αντιδρούν κατευθείαν με ρίζες υπεροξειδίου που σχηματίζονται κατά την υπεροξείδωση των λιποειδών. Μελέτες σε ζώα απέδειξαν πως το β-καροτένιο είναι ικανό να μειώσει την επαγόμενη από αλκυλιωτικούς και προκαρκινικούς παράγοντες καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων.⁴⁵ Δρα κυρίως στο εσωτερικό της μεμβράνης συνεργιακά με την βιταμίνη E. Οι πηγές του καροτενοειδούς είναι κυρίως τα έντονα χρωματισμένα φρούτα και λαχανικά, όπως καρότα, ντομάτα. Άλλες σημαντικές πηγές είναι το μπρόκολο, το σπανάκι, ο αρακάς και η κολοκύθα.⁴⁶

ε) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό. Από *in vitro* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προκύπτει πως η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν προ-οξειδωτικά ένζυμα ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με προ-οξειδωτικά ιόντα όπως Fe^{2+} , Fe^{3+} ή Cu^{2+} . Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης άμεση δράση παγίδευσης κάποιων ROS με άμεση δωρεά ατόμου υδρογόνου.⁴⁷⁻⁴⁸

ε) Ουβικινόλη

Αποτελεί την ανηγμένη μορφή της ουβικινόνης (συνένζυμο Q) η οποία είναι το κρίσιμο μικρό μόριο για την μεταφορά των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και την συνεπακόλουθη παραγωγή ενέργειας. Έχει αναγνωριστεί ως ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό σταματώντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και μειώνει την καταστροφή του DNA. Πιστεύεται πως έχει θετικά αποτελέσματα ως προς την αντιγήρανση.⁴⁹

στ) Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελευταίο προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Λειτουργεί δεσμεύοντας τον σίδηρο και/ή τον χαλκό με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πραγματοποίησης των οξειδωτικών αντιδράσεων που εξαρτώνται από την παρουσία των μετάλλων.⁵⁰

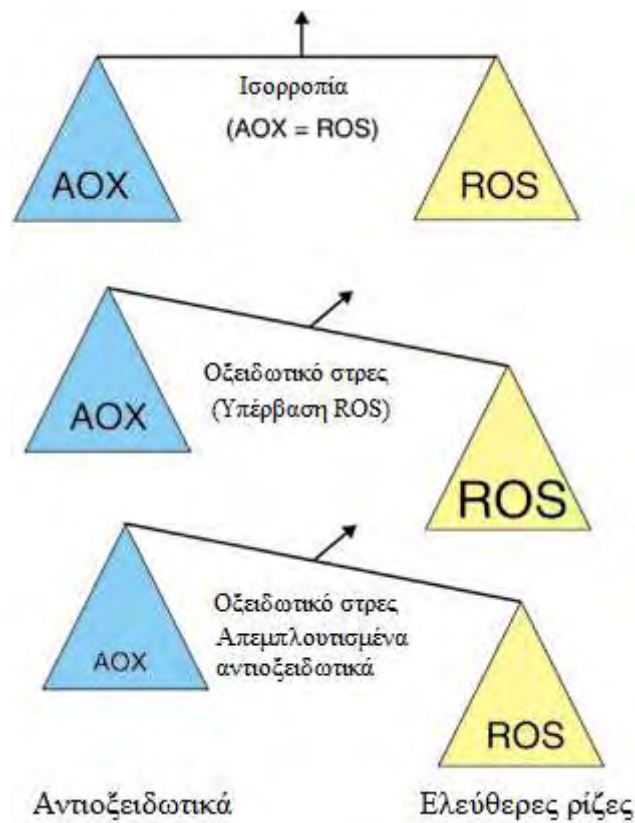
ζ) Σελήνιο

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.

1.5 Οξειδωτικό Στρες

Γενικά-Ορισμός

Η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται οξειδωτικό στρες (oxidative stress) (**Εικόνα 7**). Ποικίλοι παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής, η διατροφή, το περιβάλλον και η κληρονομικότητα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών μηχανισμών από τη μια πλευρά και των αντιοξειδωτικών από τη άλλης εις βάρους του δεύτερου σκέλους.⁵¹ Όταν υφίσταται το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται, μπορούν να προσβάλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως βάσεις DNA, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά , σάκχαρα και οργανικά οξέα. Μεγάλη είναι η σημασία του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών όπως του καρκίνου, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών και φλεγμονωδών ασθενειών, του καταρράκτη και στην διαδικασία της γήρανσης γενικότερα.⁵²⁻⁵³



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Η ανισορροπία στην οποία οφείλεται το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Συνήθως δρουν ταυτόχρονα και τα αποτελέσματα των δράσεων τους είναι προσθετικά ή συνεργατικά.

Ενδογενείς παράγοντες:

- Φυσική δραστηριότητα- καθιστικός τρόπος ζωής
- Φυσιολογικό στρες της καθημερινότητας
- Φλεγμονή (παροδική μόλυνση- χρόνια ασθένεια)
- Καρκίνος
- Ισχαιμία/ Επαναιμάτωση
- Κυτταρικός θάνατος

Εξωγενείς παράγοντες :

- κατανάλωση τροφής
 - Διατροφή πλούσια σε λίπος ή πρωτεΐνη
 - Χαμηλή κατανάλωση αντιοξειδωτικών
 - Κατανάλωση αλκοόλ/καφέ
- Αερομεταφερόμενοι ρύποι
 - Καπνός τσιγάρου
 - Μόλυνση του αέρα (SO₂, NO₂, O₃)
 - Μεταβατικά μέταλλα, αμίαντος.
- Φαρμακευτική αγωγή
 - Αντικαρκινικά φάρμακα
- Ακτινοβολία
 - Ιονίζουσα ακτινοβολία
 - Υπεριώδης ακτινοβολία
 - Μικροκύματα

1.5.1. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει 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 (**Εικόνα 8**). Οι πρωτεΐνες 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. Στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο δεν απελευθερώνεται το περιεχόμενό τους με αποτέλεσμα να μην προκαλείται βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα.



Εικόνα 8: Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

1.5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση 1) των ελευθέρων ριζών, 2) των βλαβών σε λιπίδια, πρωτεΐνες ή DNA και 3) της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Αναλυτικότερα, για την μέτρηση των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται μια άμεση φασματοσκοπική μέθοδος που επιτρέπει την άμεση μέτρηση των ROS σύμφωνα με τις παραμαγνητικές τους ιδιότητες.⁵⁴⁻⁵⁶ Η λιπιδιακή υπεροξειδωση οδηγεί σε καταστροφή των λιπιδίων και στον σχηματισμό της μαλονδιαλδεύδη. Η μαλονδιαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, που παράγει τις δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS). Η τροποποίηση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί το σχηματισμό καρβονυλομάδων στα αμινοξέα των πλευρικών αλυσίδων. Έτσι, η μέτρηση του σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεϊνικής βλάβης.⁵⁷⁻⁵⁸ Για την ποσοτικοποίηση των DNA τροποποιήσεων ο πιο συχνά χρησιμοποιημένος δείκτης είναι το νουκλεοτίδιο 8-OHdG, που παράγεται κατά την οξείδωση της γουανίνης από τις ελεύθερες ρίζες.⁵⁹ Τέλος, αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να πραγματοποιηθεί με εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της καταλάσης, με μετρήσεις της οξειδωμένης και της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος του αίματος.³⁵

1.6 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein)

Ο ορός γάλακτος (τυρόγαλο) είναι προϊόν αρχικής επεξεργασίας του γάλακτος που διαχωρίζεται από το τυρόπηγμα και χρησιμοποιείται για την παρασκευή μαλακών τυριών και βουτύρου και θεωρούνταν επιβλαβές για το περιβάλλον. Ωστόσο το μίγμα πρωτεϊνών που περιέχει (λακτοφερίνη, α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη, γλυκομακροπεπτιδίο και ανοσοσφαιρίνες) το καθιστούν ως ένα πολύ χρήσιμο διατροφικό στοιχείο έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος συγκριτικά με άλλες πηγές πρωτεϊνών έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις καθώς και υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, όπως λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην υπερτροφία των μυών, στην αύξηση της δύναμης, καθώς και στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών.⁶⁰⁻⁶¹ Ειδικότερα, η λευκίνη παίζει διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και έχει αναγνωριστεί ως το αμινοξύ-κλειδί στη σύνθεση μυϊκών πρωτεϊνών. Τέλος, εμφανίζουν αποτελεσματικότερη απορρόφηση και χρήση συγκριτικά με τα διαλύματα ελεύθερων αμινοξέων.⁶¹

Οι πρωτεΐνες που απομονώνονται από τον ορό του γάλακτος, έχουν βρει εφαρμογή σε εμπορική κλίμακα, καθώς η χρήση των απομονωμένων ή συμπυκνωμένων τους μορφών, όπως και των βιοδραστικών τους πεπτιδίων ως συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά σκευάσματα ή ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων, παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο για τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων όσο και για τη μείωση των προβλημάτων ρύπανσης που είχαν συνδεθεί με τη διάθεση του ορού γάλακτος.⁶⁰

Λακτοφερίνη

Η λακτοφερίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 689αα που ανήκει στους μεταφορείς σιδήρου της οικογένειας των τρανσφερινών και πρόκειται για μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό. Αρχικά απομονώθηκε από το βόειο γάλα αλλά απαντά και στο γάλα άλλων ζώων. Επιπροσθέτως, βρίσκεται και στις εξωκρινείς εκκρίσεις των θηλαστικών πέρα από το γάλα. Η λακτοφερίνη θεωρείται ως πολυλειτουργική πρωτεΐνη καθώς φαίνεται ότι έχει διάφορους βιολογικούς ρόλους. Εξαιτίας της ικανότητας της να δεσμεύει το σίδηρο, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου από το βλεννογόνο του εντέρου των θηλαζόντων βρεφών. Επίσης, φαίνεται ότι έχει αντιβακτηριακή, αντιιική, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ανοσορυθμιστική δράση.

α-λακταλβουμίνη

Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως η χαρακτηριστική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Απαντά στο γάλα όλων των θηλαστικών και αποτελεί πηγή απαραίτητων και διακλαδισμένων αμινοξέων. Τέλος, επάγει την απόκριση των Β-λεμφοκυττάρων σε αντιγόνα.

β-λακτογλοβουλίνη

Η β-λακτοσφαιρίνη απαντά μόνο στα σπληφόρα ζώα και είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Αποτελεί πηγή απαραίτητων αμινοξέων και διαθέτει μια δομική περιοχή που μεταφέρει ρετινοειδή, καθιστώντας την ικανή να ρυθμίζει τη δράση λεμφοκυττάρων.⁶²

Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούν βασική πρωτεΐνη του ανθρώπινου γάλακτος και από μελέτες έχει προκύψει ότι προσδίδουν ανοσία στον άνθρωπο ενάντια σε ροταϊούς καθώς και σε βακτήρια όπως E. coli, Salmonella enderiditis, S. Typhimurium και Shigella flexneri.⁶³⁻⁶⁴

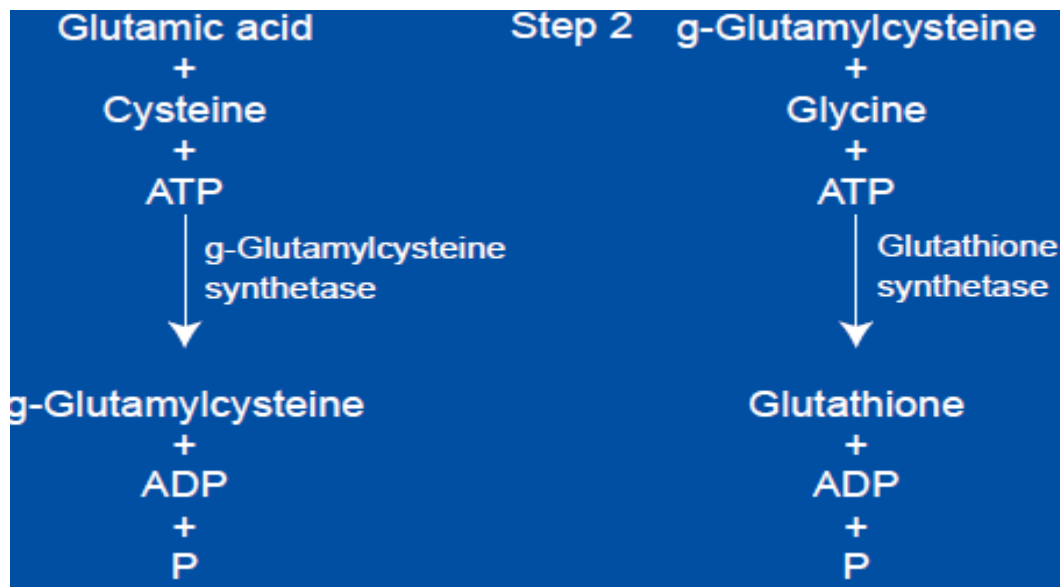
Γλυκομακροπεπίδιο

Το γλυκομακροπεπίδιο 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.

Λακτοπεροξειδάση

Η λακτοπεροξειδάση έχει αναγνωριστεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας στο γάλα, το σάλιο και τα δάκρυα. Πρόκειται για ένα φυσικό σύστημα άμυνας εναντίον των βακτηρίων μέσω της οξειδωσης τωνθειοκυανικών ιόντων (SCN-) από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τα τελευταία είναι και τα δύο παρόντα στα βιολογικά υγρά και μαζί με τη λακτοπεροξειδάση αποτελούν το σύστημα της λακτοπεροξειδάσης (LP-s). Το LP-s έχει αποδειχθεί βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό σε μία ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών, χωρίς να επιδρά στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα των μικροοργανισμών που το παράγουν.⁶⁵⁻⁶⁶

Ως προς τον μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, φαίνεται ότι οφείλεται κυρίως στη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε κυστεΐνη η οποία χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για την παραγωγή γλουταθειόνης (**Εικόνα 9**), η οποία αποτελεί ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό.⁶⁰ Η γλουταθειόνη αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμικό και κυστεΐνη. Η τελευταία περιέχει μια ομάδαθειόλης που χρησιμεύει ως ένας δραστικός αναγωγικός παράγοντας στην πρόληψη της οξειδωσης και της βλάβης των ιστών. Η γλουταθειόνη είναι πιο δραστική στην ανηγμένη μορφή της.



Εικόνα 9: Βιοσύνθεση της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης

1.6.1 Διαδικασία παρασκευής πρωτεΐνης ορού γάλακτος

Το πλήρες γάλα βοοειδών 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, έχοντας μία συγκέντρωση περίπου 65%.

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 μοσχாரιών. 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 να ρυθμιστεί το pH 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. Σκοπός

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

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

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

3.1.2. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

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, Gibco BRL 41966)

- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

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

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

Πίνακας 3.1.2.1: Η σύσταση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας των κυττάρων C2C12.

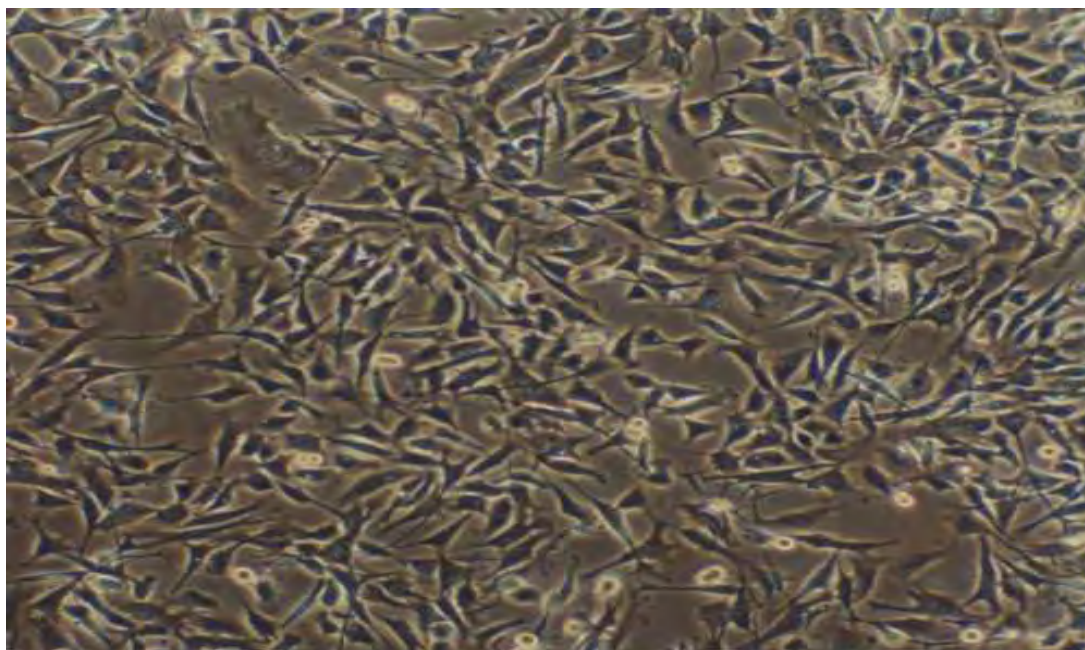
Υπόλοιπα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας
1. Θρυψίνη 0.25 % - Gibco
2. PBS pH 7.4 - Phosphate buffer saline 1x – Gibco
3. Απιονισμένο νερό

Πίνακας 3.1.2.2: Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

3.1.3 Μυϊκά κύτταρα C2C12

Τα μυϊκά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12 (**Εικόνα 10**). 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. Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 10: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

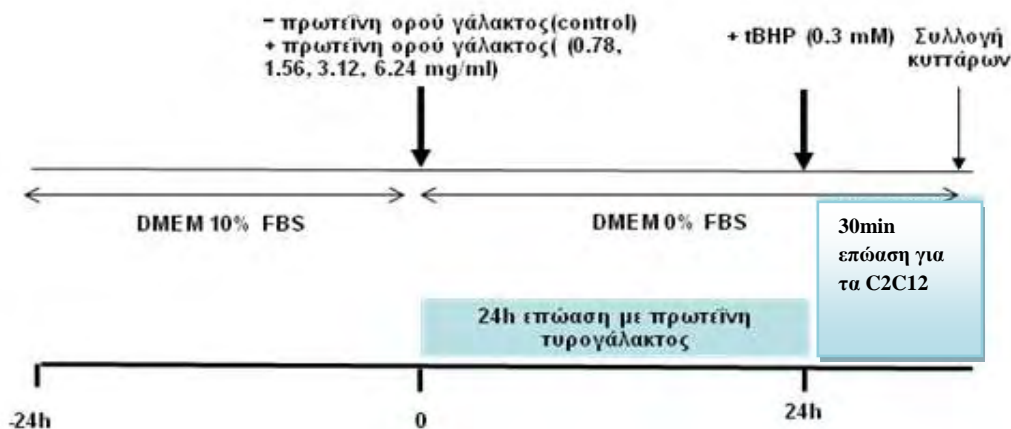
3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (C2C12)

Οι μυοβλάστες αναπτύχθηκαν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 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 1 mL 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).

3.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες και της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην **Εικόνα 11**. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και καλλιεργήθηκαν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH, της GSSG, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της TAC με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml για τις 75cm² φλάσκες), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO₂. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (1 ml για τις 75cm² φλάσκες) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL). Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Μετά την προσθήκη πρωτεΐνης ακολουθεί επώαση για 24 h. Μετά το τέλος της επώασης, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος αφαιρείται και προστίθεται ο παράγοντας tBOOH (0.3 mM). Τα μυϊκά C2C12 κύτταρα μετά την προσθήκη του tBOOH (0.3 mM) επωάζονται για 30 min. Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (1 ml για τις 75cm² φλάσκες) (0.25%), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 3000g, στους 4°C για 10 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 1 mL PBS και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, αφαιρείται το υπερκείμενο και κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL PBS. Έπειτα διαρρηγνύουμε τα κύτταρα με υπερήχους για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500g για 15 min στους 4 °C και συλλογή του υπερκείμενου, που αποτελεί το κυτταρικό αιώρημα. Τέλος, ακολούθησε ο προσδιορισμός της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων φασματοφωτομετρικά, αφού προηγήθηκε ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.



Εικόνα 11: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα μυϊκά C2C12 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του t-BOOH. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

3.2.3 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή της μεθόδου

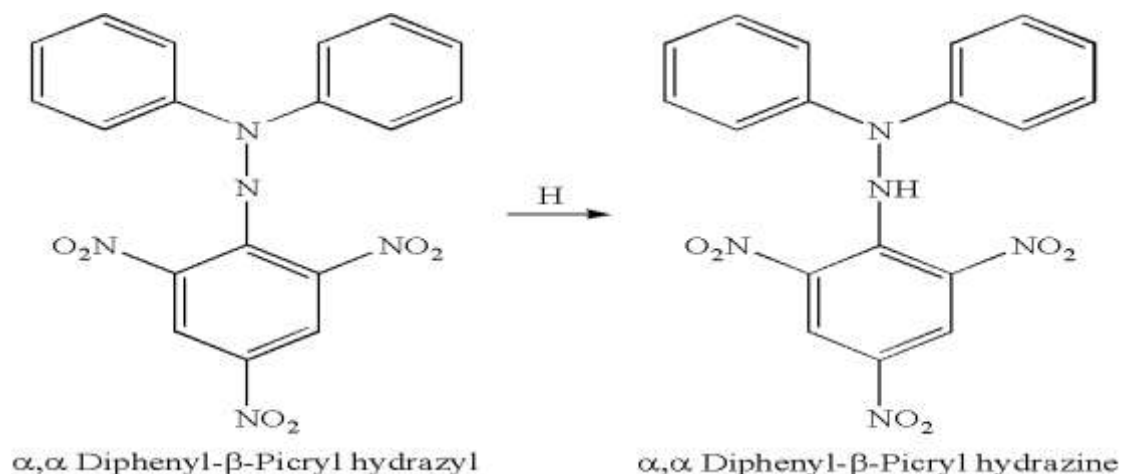
Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο δύσκολος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τιςθειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά

σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο). Το διάλυμα της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη) (**Εικόνα 12**), η οποία έχει κίτρινο χρώμα με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση.³⁵



Εικόνα 12: Σχηματική παρουσίαση της αναγωγής του DPPH παρουσία H[•]

Πειραματική διαδικασία

Πραγματοποιείται συλλογή των καλλιεργούμενων κυττάρων με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και στη συνέχεια τα κύτταρα διαρρηγνύονται στο Sonicator και στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση οπτικής απορρόφησης.

Η αντίδραση προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) πραγματοποιείται σε όγκο 1mL στον οποίο περιέχονται 50 μ L κυτταροπλασματικού αιωρήματος, 450 μ l ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4, 10 mM) (495 μ L για το θετικό Control και 500 μ L για το τυφλό) και 500 μ l διαλύματος ρίζας DPPH[•] 0,1 mM (50 μ M τελική συγκέντρωση ρίζας). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 20000 g για 3 min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως τα μ mol της ρίζας DPPH[•] που ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH-H) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταροπλασματικού αιωρήματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10 μ g απόλυτη ποσοτητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TAC (}\mu\text{mol DPPH} \cdot \text{ / mg πρωτεΐνης)} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 0.05 \times 20 / C_\delta$$

A_0 : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_δ : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (κυτταροπλασματικό αιώρημα).

Τιμή 0.05: η συγκέντρωση $\mu\text{mol/mL}$ της ρίζας DPPH στην αντίδραση.

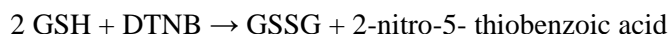
Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ. αντίδρασης}} / \mu\text{L αιωρήματος [1000 } \mu\text{L} / 20 \mu\text{L]}$).

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

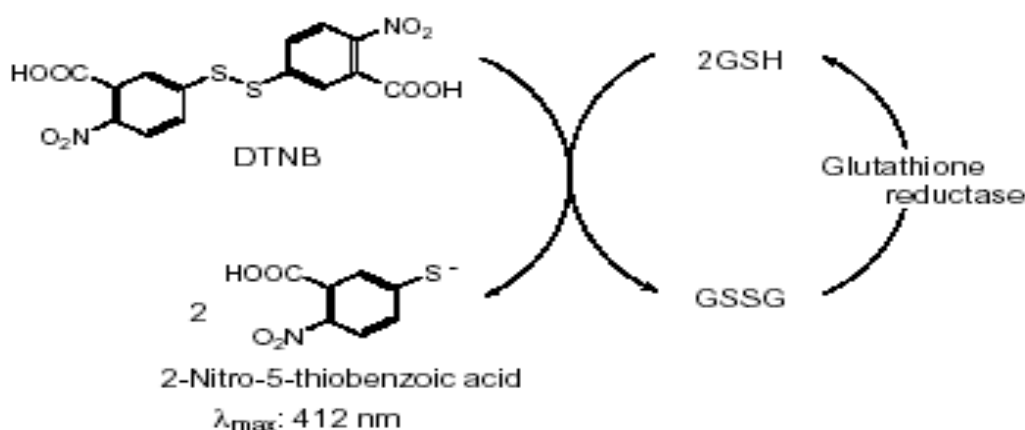
3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδου νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε κυτταρικό αιώρημα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (**Εικόνα 13**), το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (**Εικόνα 13**).³⁵



Εικόνα 13: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Πειρατική διαδικασία

Η αντίδραση προσδιορισμού της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) πραγματοποιείται σε όγκο 1mL στον οποίο περιέχονται 150μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος, 520μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 8, 67mM), 330μL DTNB (1mM) και 150μL PBS. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45min. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412nm (μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα). Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσοτητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol GSH / mg πρωτεΐνης} = [(A_{\delta} - A_0) / 13.6 \times 6.6 \times 1000] / C_{\delta}$$

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

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ϵ_{GSH} ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της GSH

Τιμή 6.6: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ. αντίδρασης}} / \mu\text{L αιωρήματος [1000 } \mu\text{L} / 150 \mu\text{L]}$).

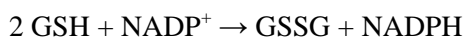
C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της GSSG γίνεται έμμεσα και βασίζεται στην αναγωγή της GSSG σε GSH μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Η GSH οξειδώνεται από το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

Στην αντίδραση προστίθεται το διάλυμα της 2-βινυλ-πυριδίνης το οποίο εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να παρεμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Για την μετατροπή της GSSG του δείγματος σε GSH και την δημιουργία του χρώματος προστίθεται το NADPH. Η αντίδραση είναι η εξής:



Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GSSG, σε 50 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος (pH 7,4) προστίθενται 5 μL αραιωμένου 1/100 διαλύματος 2-βινυλ-πυριδίνης. Τα δείγματα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 600 μL 143 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100 μL διαλύματος NADPH 3 mM, 100 μL διαλύματος DTNB 10 mM, 189 μL PBS (199 μL για το τυφλό και 124 μL για το Standard) και 10 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος που έχει επωαστεί με το 2-vinyl-pyridine. Τα δείγματα αναδευονται και επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστίθενται 1 μL ενζύμου GR. Αμέσως μετά την προσθήκη τους ενζύμου ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm για 3 min. Τα δείγματα χωρίς το κυτταροπλασματικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Απαιτούνται >30 μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol GSSG / mg πρωτεΐνης} = [[(A_{\delta} - A_0) \times 0.75] / (A_{\pi} - A_0) \times 100] / 2] / C_{\delta}$$

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

A_0 : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

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

Τιμή 0.75: Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης του πρότυπου δείγματος $\mu\text{mol/L}$ (nmol/mL).

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

Τιμή 2: Όστε να συνυπολογιστεί η στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ($2 \text{ GSH} \rightarrow 1 \text{ GSSG}$).

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

3.2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες γενικά και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι γενετικοί δείκτες οξείδωσης και είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι. Είναι γενικά δείκτες πρωτεϊνικής οξείδωσης και πιθανόν οι πιο αξιόπιστοι. Οι καρβονυλικές ομάδες όπως αλδεύδες και κετόνες παράγονται κυρίως στην πλευρική αλυσίδα πρωτεΐνης του Pro, Arg, Lys, Thr. Είναι προτιμώμενοι δείκτες και ένας λόγος για αυτό είναι το γεγονός ότι είναι σταθερά τμήματα.

Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες είναι αναντιστρεπτά κατεστραμμένες. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι μετρίως καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα, αλλά εάν είναι σοβαρές οι ζημιές, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται σχηματίζοντας συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Η πρωτεϊνική οξειδωτική καταστροφή, δεν έχει μόνο αντίκτυπο στην λειτουργία της ίδιας της πρωτεΐνης, αλλά και στον τρόπο δράσης άλλων βιομορίων.

Ο σχηματισμός καρβονυλίων εντοπίζεται συνήθως στην αντίδραση με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη και μετατροπής του σε 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνη.

Πειραματική διαδικασία

Σε 200 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του) προστίθενται 200 μL 20% TCA, τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μL DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 500 μL 2.5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 λεπτά και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1 mL 5M ουρίας (pH 2.3)

και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 375nm.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DNPH. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0.022 \times 5] / C_{\delta}$$

Abs sample: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Abs blank: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

ϵ_{375} DNPH (nmol/mL): 0.022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L}$ πλάσματος [1000 μL /200 μL]).

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

3.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω 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 $\mu\text{g/mL}$. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό

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

3.3 Στατιστική ανάλυση

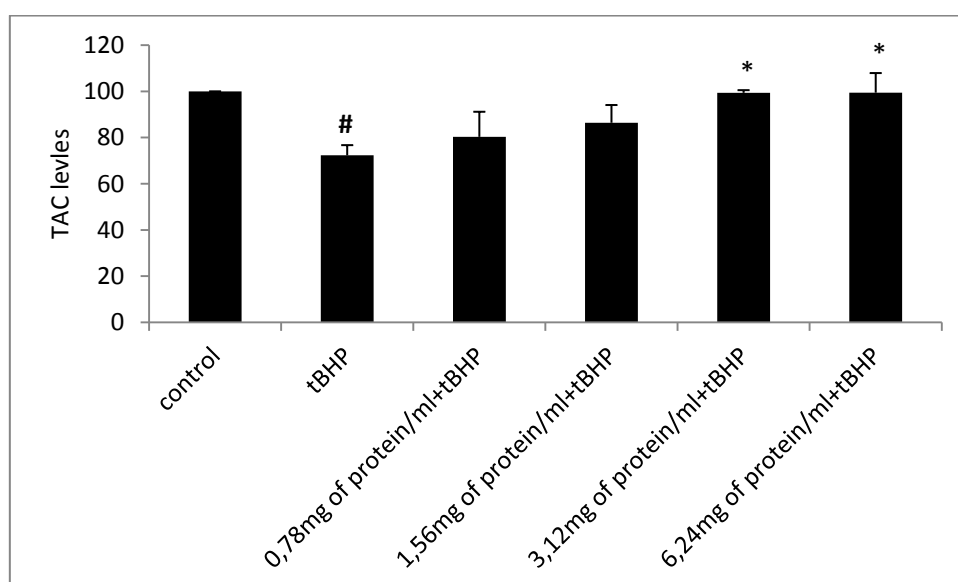
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard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

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

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

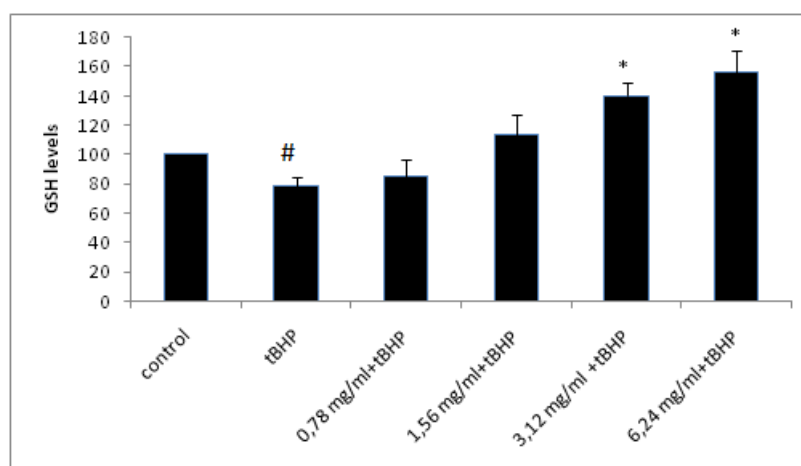
Τα επίπεδα της TAC στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν σημαντικά κατά 27.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της TAC κατά 11%, 19.5%, 37% και 37.5% σε σχέση με τα επίπεδα της TAC στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 1 τα επίπεδα της TAC στις συγκεντρώσεις 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα στο οποίο χορηγήθηκε μόνο ο αυξητικός παράγοντας



Γράφημα 1: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

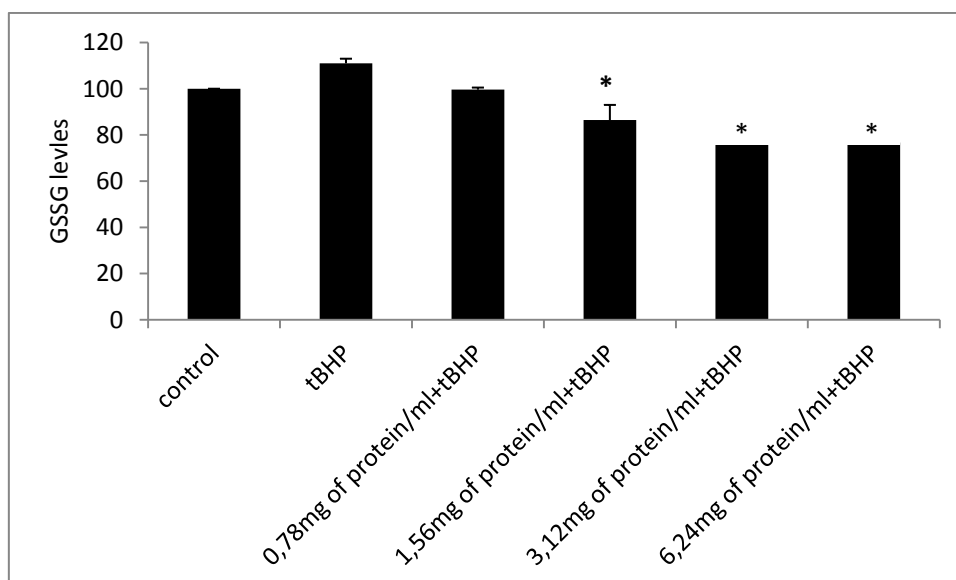
Τα επίπεδα της GSH στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν κατά 21.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της GSH κατά 8.09%, 45%, 78.90% και 99% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 2 τα επίπεδα της GSH στις συγκεντρώσεις 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα στο οποίο χορηγήθηκε μόνο ο αυξητικός παράγοντας.



Γράφημα 2: Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

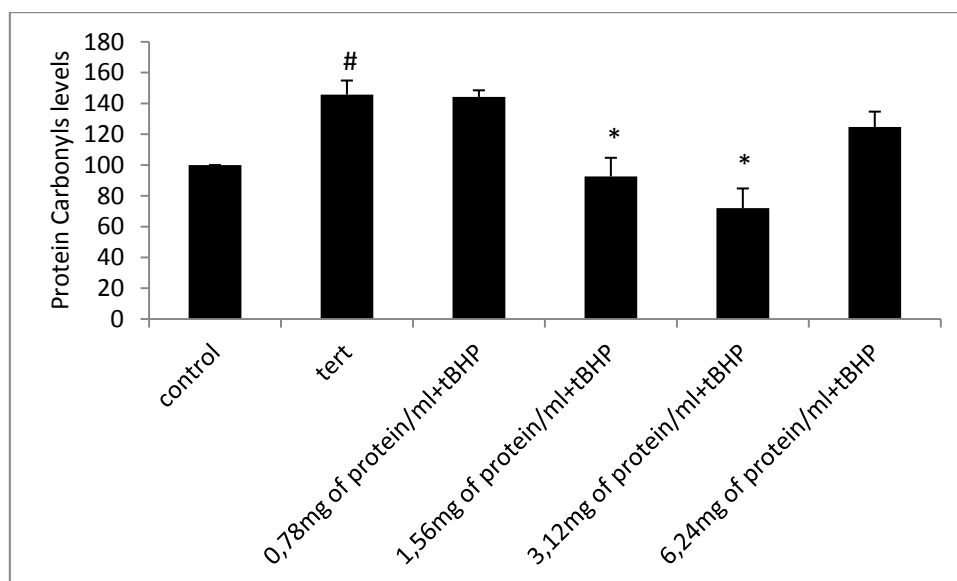
Τα επίπεδα της GSSG στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκαν κατά 11% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της GSSG κατά 10%, 22%, 30% και 31% σε σχέση με τα επίπεδα της GSSG στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται και στο γράφημα 3 τα επίπεδα της GSSH στις συγκεντρώσεις 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το δείγμα στο οποίο χορηγήθηκε μόνο ο αυξητικός παράγοντας.



Γράφημα 3: Επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκε σημαντικά κατά 45.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 0.99%, 36%, 51% και 14% σε σχέση με την συγκέντρωσή τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 4 τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις συγκεντρώσεις 1.56% και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα στο οποίο χορηγήθηκε μόνο ο αυξητικός παράγοντας.



Γράφημα 4: Επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίου στην κυτταρική σειρά C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (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 ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

5. Συζήτηση

Οξειδωτικό στρες ονομάζεται η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες. Πιο αναλυτικά, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει 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. Επιπρόσθετα, η εν λόγω διαταραχή συνδέεται και με πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, μολονότι οι ελεύθερες ρίζες κρίνονται απαραίτητες σε χαμηλά επίπεδα για την ορθή λειτουργία του οργανισμού.

Όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες και επιδιορθώνουν κατεστραμμένα μόρια. Ωστόσο, οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ανεπαρκείς και η λήψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον. Συνεπώς, αν ένα σκεύασμα έχει την ικανότητα να μειώνει τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη αρκετών παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στο προκαλούμενο από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH οξειδωτικό στρες στην μυϊκή κυτταρική 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 της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Τα επίπεδα της GSH στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν κατά 21.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της GSH κατά 8.09%, 45%, 78.90% και 99% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στην ίδια κυτταρική σειρά (C2C12) υπό την επίδραση διαφορετικού οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), η

επώαση με 0,5mg/ml πρωτεΐνης ορού γάλακτος (80,5% περιεκτικότητα) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης κατά 70%.⁶⁷ Σε μια άλλη έρευνα, 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.⁶⁸ Ακόμα μια έρευνα έδειξε ότι η υδρολυμένη πρωτεΐνη (90,5% περιεκτικότητα) συγκέντρωσης 0,5mg/ml προκάλεσε αύξηση της γλουταθειόνης κατά 64% σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προστάτη.⁶⁹

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 ορού γάλακτος στα επίπεδα γλουταθειόνης φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα αυτών σε κυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα της γλουταθειόνης, ωστόσο είναι και το αμινοξύ που καθορίζει το ρυθμό βιοσύνθεσης της, καθώς υπάρχει ανταγωνισμός για τη χρήση της κυστεΐνης είτε για την παραγωγή GSH είτε για την πρωτεϊνοσύνθεση, 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.⁷⁰⁻⁷³

Τα επίπεδα της GSSG στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκαν κατά 11% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της GSSG κατά 10%, 22%, 30% και 31% σε σχέση με τα επίπεδα της GSSG στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με την αύξηση της συγκέντρωσης της GSH που παρατηρήθηκε κατά τον προσδιορισμό της. Πιο συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη είναι παρούσα στα κύτταρα τόσο στην ανηγμένη (GSH) όσο και στην οξειδωμένη (GSSG) μορφή της και μεταξύ τους συμβαίνει μια αντίδραση ανακύκλωσης. Η GSH μπορεί να αναγεννηθεί από την GSSG μέσω του ενζύμου GR και η GSSG αναγεννάται από την GSH μέσω του ενζύμου GP_x. Ο παράγοντας t-BOOH οξειδώνει την GSH μέσω της δράσης της GP_x και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα GSSG.⁷⁴ Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος πιθανώς να αυξάνει τα επίπεδα της GR με αποτέλεσμα την αναγέννηση της GSH από την GSSG και έτσι να δικαιολογούνται τα μειωμένα επίπεδα της.

Τα επίπεδα της TAC στους μυοβλάστες C2C12 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH μειώθηκαν σημαντικά κατά 27.7% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της TAC κατά 11%, 19.5%, 37% και 37.5% σε σχέση με τα επίπεδα της

TAC στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

Η TAC αποτελεί δείκτη μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Εφόσον κάθε αντιοξειδωτικό συνεισφέρει διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η αύξηση των επιπέδων της TAC πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της GSH.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν δείκτη πρωτεϊνικής οξείδωσης. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας καθώς και του τρόπου που λειτουργούν άλλα βιομόρια. Μετά την επεξεργασία των μυϊκών κυττάρων C2C12 με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 45.70% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 0.99%, 36%, 51% και 14% σε σχέση με την συγκέντρωσή τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να προκληθεί από το t-BOOH που οδηγεί σε παραγωγή των ριζών tBO[•], οι οποίες είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε οξείδωση των πρωτεϊνών, είτε απευθείας από την επίθεση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων είτε έμμεσα οδηγώντας σε λιπιδική υπεροξείδωση.⁷⁵ Ακόμη, τα παραπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν σε πρωτεϊνική οξείδωση.⁷⁶⁻⁷⁷ Η χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έως και 51%. Σε προηγούμενη μελέτη μας δείχθηκε ότι μυϊκά κύτταρα C2C12 η πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης)⁷⁸. Συνεπώς, τα μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μπορεί να οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα των T-BARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης).⁷⁸

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 και συνεπώς και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που καθιστά την πρωτεΐνη ως ένα πιθανό αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα διατροφής που βοηθάει στην πρόληψη ή αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Βιβλιογραφία

1. Halliwell B., (2001). Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Engyclopedia of Life Science.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, (1989). “Free Radicals in Biology and Medicine”. 11: 416-493, 188-266.
3. Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, and Guoyao Wu (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 18:872– 879.
4. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Βιοχημεία, Τόμος Ι: κεφάλαιο 18 – οξειδωτική φωσφορύλιωση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
5. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
6. Pallavi Sharma, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, and Mohammad Pessaraki (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany.
7. Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
8. Ian Todd & Gavin Spickett, Ανασολογία, Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Μαρία Κοντού, 5^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Α.Ε.
9. Katsuhiko Suzuki, Shigeyuki Nakaji, Mutsuo Yamada, Qiang Liu, Shigeyoshi Kurakake (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 0195-9131/03/3502-1348.
10. Karol A. Kaminski Tomaz A. Bonda, Janusz Korecki, Włodzimierz J Musial (2002). Oxidative stress and neutrophil activation – the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology* 86 41-59.
11. Kuppasamy P. & Zweier J.L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264:9880-9884.
12. Downey J.M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52:487-504.

13. Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
14. 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
15. Gutteridge JM, Halliwell B (1989): Iron toxicity and oxygen radicals., *Baillieres Clin Haematol.*, 2: 195-256.
16. Lee SJ, Yang ES, Kim SY, Kim SY, Shin SW, Park JW (2008). Regulation of heat shock-induced apoptosis by sensitive to apoptosis gene protein. *Free Radic Biol Med.*, 45: 167-176.
17. Plant DR, Gregorevic P, Williams DA (2001). Redox modulation of maximum force production of fast-and slow-twitch skeletal muscles of rats and mice. *J Appl Physiol.*, 90: 832-838.
18. Zhang SJ, Bruton JD, Katz A, Westerblad H (2006). Limited oxygen diffusion accelerates fatigue development in mouse skeletal muscle. *J Physiol.*, 572: 551-559.
19. Peake J, Nosaka K, Suzuki K (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev.*, 11: 64-85.
20. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH (2002). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 781: 481-496.
21. Kanter M (1998). Free radicals, exercise and antioxidant supplementation., *Proc Nutr Soc.*, 57: 9-13.
22. Lännergren J, Westerblad H, Bruton JD (1996). Slow recovery of force in single skeletal muscle fibres., *Acta Physiol Scand.*, 156: 193-202.
23. Urso ML, Clarkson PM (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation., *Toxicology.*, 189: 41-54.
24. Dizdaroglu M (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases., *Mutat Res.*, 591: 45-59.
25. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T (2004). Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise., *Free Radic Biol Med.*, 37: 480-487.
26. Halliwell B, Gutteridge CMJ (1999). *Free Radicals In Biology and Medicine*. New York, Oxford University Press.

27. Halliwell B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658.
28. Rune Blomhoff (2005). Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Current opinion on Lipidology*, 16(1): 47-54
29. Culotta, V.C., Yang, M., O'Halloran, T.V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 747–758.
30. Antunes, F., Han, D., Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1260-1267.
31. Callahan, L.A., Nethery, D., Stofan, D., DiMarco, A., Supinski, G. (2001). Free radical-induced contractile protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24: 210–217.
32. Bjornstedt, M., Kumar, S., Bjorkhem, L., Spyrou, G., Holmgren, A. (1997). Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed. Environ. Sci.* 10: 271–279.
33. Demming-Adams B, Adams WIII. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition, 2002. *Science*, 298: 2149 – 2153
34. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress, 2000. *Am J Med* 108: 652-659
35. Κουρέτας Δ. & Στάγκος Δ., Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
36. Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A. and Moreno-Sanchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 653-671.
37. May, M. J., Qu, C. Z. and Neel, R. D. (2003). Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1640: 153-161.
38. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J, (2000). Glutathione metabolism in brain. Metabolic interactions between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267: 4912-4916.

39. Bains JS, Shaw CA. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death *Brain Res Rev.* 25: 335-58.
40. Frei B (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 54: 11135-185.
41. Bigard, A.X. (2001). Lesions musculaires induites par l' exercice et surentrainment. *Sci. Sports.* 16: 204-215.
42. Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Morrow, J.D. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary Ig A changes following an ultramarathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89: 100-107.
43. Wayner DDM, Burton GM, Ingold KU, et al. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*, 924: 408-19.
44. Mascio P, Murphy M, Sies H (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr*, 53: 1945-2005.
45. Renata Cozzi, Ruggero Ricordy, Tania Aglitti, Valentina Gatta, Paolo Perticone and Rosella De Salvia (1997). Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis.* 18: 223-228.
46. Sareen S. Gropper, Jack L. Smith, Jamew L. Groff (2007). Διατροφή και μεταβολισμός, 4η έκδοσης, ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
47. Willcox, J.K., Catignani, G.L., Roberts, L.J. (2002). Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 795-799.
48. Wedworth, S.M., Lynch, S. (1995). Dietary flavonoids in arterosclerosis prevention. *Ann. Pharmacother.* 29: 627-628.
49. Hitoshi Masaki. Role of antioxidants in the skinQ Anti-aging effects. *Dermatol Sci.* (2010). 58:85-90.
50. Marklund N, Ostman B, Nalmo L, et. al. (2000). Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions: description of a HPLC method and human brain microdialysis. *Acta Neurochir (Wien)*, 142: 1135-1142.

51. Moller P, Wallin H, Knudsen LE (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and lifestyle factors. *Chem-Biol Inter* 102: 17-3.
52. Niki E (2001). Free radicals in the 1990's: from in vitro to in vivo. *Free Radic Res*, 33: 693 – 704.
53. Young Is, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease *J Clin Path* 54: 76 - 86.
54. Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., Young, I.S., Jackson, S.K., Davies, B., Peters, J.R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 77(6): 498-502.
55. Ashton, T., Young, I.S., Peters, J.R., Jones, E., Jackson, S.K., Davies, B., Rowlands, C.C.(1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J. Appl. Physiol.* 87: 2032-2036.
56. Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Tierernahr.* 52: 203-222.
57. Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899: 191-208.
58. Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
59. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1102-1115).
60. Walzem, R.L., Dillard, C.J., German, J.B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 353-375.
61. Daenzer, M., Petzke, K.J., Bequette, B.J., Metges, C.C. (2001). Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J. Nutr.* 131: 1965- 1972.
62. Guimont, C., Marchall, E., Girardet, J.M., Linden, G. (1997). Biologically active factors in bovine milk and dairy byproducts: influence on cell culture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 393-410.

63. Yolken, R.H., Losonsky, G.A., Vonderfecht, S., Leister, F., Wee, S.B. (1985). Antibody to human rotavirus in cow's milk. *N. Engl. J. Med.* 312: 605-610.
64. Losso, J.N., Dhar, J., Kummer, A., Li-Chan, E., Nakai, S. (2008). Detection of antibody specificity of raw bovine and human milk to bacterial lipopolysaccharides using PCFIA. *Food Agric. Immunol.* 5: 231-239.
65. Bjorck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotropic bacteria in milk. *J. Dairy Res.* 45: 109-118.
66. Kussendrage, K.D., van Hooijdonk, A.C. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84: 19-25.
67. Xu, R., Liu, N., Xu, X., Kong, B. (2011). Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J. Dairy Sci.* 94: 3739-3746.
68. Tseng Y.M., Lin S.K., Hsiao J.K., Chen I J., Lee J.H., Wu S.H., Tsai L.Y. (2006), Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure. *Food Chem.Toxicol.* 44: 574-578.
69. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA (2003). Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 17: 27-33.
70. Sen, C.K. (1997). Nutritional biochemistry of glutathione. *Nutritional Biochemistry* 8: 660-672.
71. Anderson, M.E., (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 1-14.
72. Lu S., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal* 13: 1169-1183.
73. Griffith O.W., (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27 (9-10): 922-935.
74. Lima C.F., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 79: 2056-2068.
75. 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.

76. Kim, J.G., Sabbagh, F., Santanam, n., Wilcox, J.N., Medford, R.M., Parthasarathy, S. (1997). Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 23: 251-259.
77. Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. (1997). Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein, *Biochem. J.* 322: 317-325.
78. Kerasioti E., Stagos D., Priftis A., Aivazidis S., Tsatsakis A. M., Wallace Hayes A., Kouretas D., (2014), Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry* 155:271-278.