

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



**“ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ  
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ  
ΣΤΡΕΣ, ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΞΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΣΚΗΣΗ ΣΕ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ “**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΚΕΡΑΣΙΩΤΗ ΕΥΘΑΛΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

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

**“ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ  
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ  
ΣΤΡΕΣ, ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΞΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΣΚΗΣΗ ΣΕ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ “**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΚΕΡΑΣΙΩΤΗ ΕΥΘΑΛΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

**‘ Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους ‘**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Α. ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης. Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Β. ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ:** Καθηγητής Φυσικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Α. ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης. Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Β. ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ:** Καθηγητής Φυσικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

**Α. ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ:** Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**Α. ΤΣΑΚΑΛΙΩΦ:** Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ:** Καθηγητής Γενικής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ:** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2011-2014 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, κ. Δημήτριου Κουρέτα. Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Το αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης ήταν:

- i. Η ανάπτυξη ενός σκευάσματος υδατανθράκων - πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε αναλογία 3.5:1 υπό στερεά μορφή με αποδεκτά φυσικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.
- ii. Η επίδραση του σκευάσματος υδατανθράκων - πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής σε αθλητές μετά από εξαντλητική άσκηση.
- iii. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών της πρωτεΐνης ορού γάλακτος *in vitro*.
- iv. Η προστατευτική δράση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στο επαγόμενο από οξειδωτικό παράγοντα - οξειδωτικό στρες στις κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy926.
- v. Ο προσδιορισμός του μοριακού μονοπατιού μέσω του οποίου η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί τις ευεργετικές τις επιδράσεις.

### *Επεξήγηση όρων*

Πρωτεΐνη ορού γάλακτος: Είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που παραμένουν στην υγρή φάση κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού μετά την καθίζηση της καζεΐνης του γάλακτος.

Οξειδωτικό στρες: Χαρακτηρίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού υπέρ των πρώτων.

Ελεύθερη ρίζα: Χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα.

Αντιοξειδωτικό: Χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος.

#### *Δημοσιεύσεις*

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις:

- Kerasioti E., Stagos D., Priftis A., Aivazidis S., Tsatsakis A.M., Hayes A.M., Kouretas D. (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry*, 155:271-278.

- Kerasioti E., Stagos D., Jamurtas A., Kiskini A., Koutedakis Y., Goutzourelas N., Pournaras S., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2013). Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-whey protein cake after exhaustive cycling in humans. *Food & Chemical Toxicology*. 61:42-46.

- Kerasioti E., Kiskini A., Veskoukis A., Jamurtas A., Tsitsimpikou C., Tsatsakis A.M., Koutedakis Y., Stagos D., Kouretas D., Vaios K. (2012). Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food & Chemical Toxicology*. 50(8):2805-2810.

-Kerasioti E., Stagos D., Georgatzi V., Bregu E., Kouretas D. (2014). Antioxidants effects of whey protein on endothelial cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (submitted).

-Kerasioti E., Stagos D., Tzimi A., Kouretas D. (2014). Whey protein increases antioxidant capacity through Nrf2-dependent mechanism in endothelial cells and Nrf2-independent mechanism in c2c12 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*. (submitted).

-Kerasioti E., Stagos D., Kouretas D. (2014). Antioxidant activity of whey protein. *Antioxidants and Redox Signaling*. (submitted)

## *Ευχαριστίες*

Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτό το σημαντικό βήμα στη ζωή μου και που μέσω αυτής της εμπειρίας έμαθα να μην τα παρατάω στα δύσκολα.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Στάγκο που ήταν πάντα δίπλα μου σε όποιο πρόβλημα και απορία είχα, πάντοτε πρόθυμος να με βοηθήσει και να με συμβουλευσει.

Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα και τον καθηγητή κ. Βάιο Καραθάνο για τις υποδείξεις τους και την προθυμία τους να απαντήσουν κάθε μου ερώτηση. Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Αριστείδη Τσατσάκη, τον καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουγιάν και τον επίκουρο καθηγητή Ανδρέα Τσακάλωφ, οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Για την ολοκλήρωση της διατριβής έβαλαν το λιθαράκι τους ένας αριθμός ατόμων που θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη βοήθεια τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους Αλέξανδρο Πρίφτη, Στέφανο Αϊβαζίδη, Ερίντα Μπρέγκου, Γιώργο Τσετσέκο, Βασιλική Γεωργαντζή και Αγγελική Τζίμη για την πολύ καλή συνεργασία τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής τους εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον συνάδελφο Νίκο Γκουντζουρέλα για τη βοήθεια του, την Αγγελική Τζίμη και το Αναστάσιο Μπέσιο για τη φιλία τους, την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε τη χρειαζόμουν.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στην οικογένεια μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια και σε ένα σημαντικό για μένα πρόσωπο, που υπάρχει στη ζωή μου, που πίστεψε σε μένα και δε με άφησε ποτέ να τα παρατήσω.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα εικόνων.....	16
Περιεχόμενα πινάκων.....	18
Περιεχόμενα γραφημάτων.....	19
Συντομογραφίες.....	22
Περίληψη.....	26
Abstract.....	28

### Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1. Ελεύθερες ρίζες

1.1. Γενικά.....	31
1.2. Κύρια Δραστικά Είδη Ελευθέρων Ριζών .....	33
1.2.1. Ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	33
1.2.2. Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ).....	33
1.2.3. Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ).....	34
1.2.4. Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).....	34
1.2.5. Μονοξειδίο του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ).....	35
1.2.6. Υπεροξεινιτρικό ( $ONOO^{\cdot}$ ).....	35
1.2.7. Υπερχλωριώδες.....	35
1.3. Πηγές Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών .....	36
1.3.1. Ενδογενείς πηγές .....	36
1.3.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση .....	36
1.3.1.β. Ουδετερόφιλα και αναπνευστική <<έκρηξη>> .....	37
1.3.1.γ. Οξειδάση της ξανθίνης .....	39
1.3.1.δ. Κυτόχρωμα $P_{450}$ .....	40

1.3.1.ε.	Αυτοοξειδωση μορίων .....	40
1.3.2.	Εξωγενείς πηγές .....	40
<b>1.4.</b>	<b>Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου .....</b>	<b>41</b>
1.4.1.	Θετικές επιδράσεις.....	41
1.4.2.	Αρνητικές επιδράσεις .....	41
<b>1.5.</b>	<b>Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....</b>	<b>44</b>
1.5.1.	Ενζυμικά αντιοξειδωτικά .....	45
1.5.1.α.	Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	45
1.5.1.β.	Καταλάση (CAT).....	46
1.5.1.γ.	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX).....	46
1.5.1.δ.	Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).....	47
1.5.2.	Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά .....	48
1.5.2.α.	Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη).....	48
1.5.2.β.	Βιταμίνη C .....	49
1.5.2.γ.	Β-καροτένιο και βιταμίνη Α (ρετινόλη).....	49
1.5.2.δ.	Φλαβονοειδή .....	50
1.5.2.ε.	Γλουταθειόνη (GSH) .....	50
1.5.2.στ.	Συνένζυμο Q <sub>10</sub> .....	51
1.5.2.ζ.	Ουρικό οξύ .....	51
1.5.2.η.	Χολερυθρίνη .....	52
<b>1.6.</b>	<b>Οξειδωτικό στρες.....</b>	<b>52</b>
1.6.1.	Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες .....	53
1.6.2.	Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες .....	54
1.6.2.α.	Άμεση ανίχνευση των ελευθέρων ριζών .....	54
1.6.2.β.	Προσδιορισμός της οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA.....	54
1.6.3.	Αντιοξειδωτικές μετρήσεις .....	55

1.6.3.α.	Ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα .....	55
1.6.3.β.	Αντιοξειδωτικές βιταμίνες .....	56
1.6.3.γ.	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα .....	56
1.6.3.δ.	Άλλα αντιοξειδωτικά .....	56
<b>1.7.</b>	<b>Οξειδωτικό στρες και άσκηση .....</b>	<b>56</b>
1.7.1.α.	Αερόβια άσκηση .....	57
1.7.1.β.	Αναερόβια άσκηση .....	58
1.7.2.	Πηγές παραγωγής ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης .....	59
1.7.2.α.	Ενδογενείς θέσεις παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ ) κατά την άσκηση	59
1.7.2.β.	Ενδογενείς θέσεις παραγωγής NO.....	61
<b>2.</b>	<b>Φλεγμονή.....</b>	<b>62</b>
<b>2.1.</b>	<b>Φλεγμονή και άσκηση .....</b>	<b>66</b>
<b>2.2.</b>	<b>Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην επαγόμενη από άσκηση φλεγμονώδη απόκριση.....</b>	<b>68</b>
<b>3.</b>	<b>Υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και άσκηση.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1.</b>	<b>Υδατάνθρακες .....</b>	<b>73</b>
<b>3.2.</b>	<b>Πρωτεΐνες .....</b>	<b>73</b>
3.2.1.	Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί πρωτεϊνών .....	74
3.2.1.α.	Απενεργοποίηση προοξειδωτικών μετάλλων .....	75
3.2.1.β.	Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών οξυγόνου.....	75
3.2.1.γ.	Αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων .....	76
3.2.2.	Πρωτεΐνες γάλακτος .....	77
3.2.2.1.	Πρωτεΐνη ορού γάλακτος .....	78
3.2.2.1.α.	Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος .....	79
3.2.2.1.β.	Βιολογικά συστατικά της πρωτεΐνης ορού γάλακτος .....	80

3.2.2.1.γ.	Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος .....	83
3.2.2.1.δ.	Κλινικές ενδείξεις για την πρωτεΐνη ορού γάλακτος .....	85

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

### Κεφάλαιο 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος *in vitro*

2.1.1.	Γενικά .....	92
2.1.2.	Υλικά και Μέθοδοι .....	93
2.1.2.α.	Αντιδραστήρια.....	93
2.1.2.β.	Πρωτεϊνικά σκευάσματα.....	94
2.1.2.γ.	Μέθοδοι.....	94
2.1.2.γ.i.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH <sup>•</sup> .....	94
2.1.2.γ.ii.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS <sup>•+</sup> .....	96
2.1.2.γ.iii.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH <sup>•</sup> .....	97
2.1.2.γ.iv.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	98
2.1.2.γ.v.	Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	100
2.1.3.	Στατιστική ανάλυση .....	100
2.1.4.	Αποτελέσματα .....	101
2.1.4.α.	Ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών .....	101
2.1.4.β.	Αποτελέσματα αναγωγικής δύναμης .....	101
2.1.5.	Συζήτηση .....	105

#### 2.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην μυϊκή κυτταρική σειρά C2C12 και την ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926

2.2.1.	Γενικά .....	107
--------	--------------	-----

2.2.1.α.	Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP .....	109
<b>2.2.2.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	<b>110</b>
2.2.2.α.	Αντιδραστήρια.....	110
2.2.2.β.	Μέθοδοι.....	110
2.2.2.β.i.	Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926.....	110
2.2.2.γ.ii.	Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο XTT.....	111
2.2.2.γ.iii.	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-BHP.....	113
2.2.2.γ.iv.	Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής.....	114
2.2.2.γ.v.	Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS.....	117
2.2.2.γ.vi.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG.....	118
2.2.2.γ.vii.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	120
2.2.2.γ.viii.	Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	121
2.2.2.γ.ix.	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	122
<b>2.2.3.</b>	<b>Στατιστική ανάλυση</b> .....	<b>122</b>
<b>2.2.4.</b>	<b>Αποτελέσματα</b> .....	<b>123</b>
2.2.4.α.	Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο XTT.....	123
2.2.4.β.	Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής.....	125
2.2.4.γ.	Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής.....	125
2.2.4.δ.	Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS.....	126
2.2.4.ε.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG.....	127
2.2.4.στ.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	127
2.2.4.ζ.	Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	127
<b>2.2.5.</b>	<b>Συζήτηση</b> .....	<b>137</b>



**2.3. Προσδιορισμός της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στον μεταγραφικό παράγοντα Nuclear factor (erythroid-derived 2) (Nrf2) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926**

<b>2.3.1. Γενικά</b> .....	140
<b>2.3.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	143
2.3.2.α. Αντιδραστήρια.....	143
2.3.2.β. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926.....	143
2.3.2.γ. Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT GCS και της ενζυμικής δράσης της CAT, SOD και GST.....	144
2.3.2.δ. Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος.....	145
2.3.2.ε. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρολύματος.....	145
2.3.2.στ. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS με τη μέθοδο Western blot.....	146
2.3.2.ζ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT.....	152
2.3.2.η. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD.....	153
2.3.2.θ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST.....	153
<b>2.3.3. Στατιστική ανάλυση</b> .....	154
<b>2.3.4. Αποτελέσματα</b> .....	155
2.3.4.α. Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων SOD-1, HO-1, CAT και GCS με τη μέθοδο Western blot.....	155
2.3.4.β. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT.....	156
2.3.4.γ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD.....	157
2.3.4.δ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST.....	157
<b>2.3.5. Συζήτηση</b> .....	171

**2.4. Επίδραση σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους**

<b>2.4.1. Γενικά</b> .....	175
----------------------------	-----

<b>2.4.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	176
2.4.2.α. Σκεύασμα υδατανθράκων-πρωτεΐνης ορού γάλακτος (αναλογία 3.5:1).	176
2.4.2.β. Συμμετέχοντες.....	177
2.4.2.γ. Διατροφή και άσκηση πριν από το πείραμα.....	178
2.4.2.δ. Πειραματικός σχεδιασμός.....	179
2.4.2.ε. Οξείδωση υδατανθράκων και λίπους.....	180
2.4.2.στ. Συλλογή αίματος και χειρισμός.....	180
2.4.2.ζ. Αντιδραστήρια.....	181
2.4.2.η. Μέθοδοι.....	181
2.4.2.η.ι. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS .....	181
2.4.2.η.ii. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	182
2.4.2.η.iii. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH .....	183
2.4.2.η.iv. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT .....	185
2.4.2.η.v. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	186
<b>2.4.3. Στατιστική ανάλυση</b> .....	187
<b>2.4.4. Αποτελέσματα</b> .....	187
2.4.4.α. Αιματολογικές μετρήσεις.....	187
2.4.4.β. Απόδοση και RPE.....	189
2.4.4.γ. Οξείδωση λίπους και υδατανθράκων.....	189
2.4.4.δ. Δείκτες οξειδωτικού στρες.....	189
<b>2.4.5. Συζήτηση</b> .....	192

## **2.5. Επίδραση σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες φλεγμονής μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους**

<b>2.5.1. Γενικά</b> .....	194
<b>2.5.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	195
2.5.2.α. Συμμετέχοντες.....	195
2.5.2.β. Αντιδραστήρια.....	196
2.5.2.γ. Μέθοδοι.....	196

2.5.2.γ.i.	Προσδιορισμός της IL-6 του πλάσματος με τη μέθοδο της ELISA.....	196
2.5.2.γ.ii.	Προσδιορισμός της IL-10 του πλάσματος με τη μέθοδο της ELISA.....	197
2.5.2.γ.iii.	Προσδιορισμός της CRP του πλάσματος με ανοσολοθιμετρική ανάλυση.....	197
<b>2.5.3.</b>	<b>Στατιστική ανάλυση</b> .....	198
<b>2.5.4.</b>	<b>Αποτελέσματα</b> .....	198
2.5.4.α.	Πρότυπη καμπύλη IL-6 και IL-10.....	198
2.5.4.β.	Δείκτες φλεγμονής.....	199
<b>2.6.5.</b>	<b>Συζήτηση</b> .....	201
<b>Κεφάλαιο 3: ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>		<b>206</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>		<b>214</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Δομή ελεύθερης ρίζας
- Εικόνα 2:** Πιθανές θέσεις σχηματισμού ROS στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων
- Εικόνα 3:** Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) από την επιστράτευση των πολυμορφοουδετερόφιλων (PMN) στο εσωτερικό του κυττάρου
- Εικόνα 4:** Ο ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα
- Εικόνα 5:** Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 6:** Στάδια λιπιδικής υπεροξειδωσης
- Εικόνα 7:** Αντίδραση πρωτεϊνικής οξειδωσης
- Εικόνα 8:** Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από τις ROS προς σχηματισμό 8-υδροξυδιογουανοσίνης (8-OHdG)
- Εικόνα 9:** Θέσεις των πρωτογενών ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών
- Εικόνα 10:** Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)
- Εικόνα 11:** Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τη βιταμίνη E
- Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση οξειδωτικού στρες
- Εικόνα 13:** Πιθανές θέσεις παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και μονοξειδίου του αζώτου (NO) στον σκελετικό μυ
- Εικόνα 14:** Τα συστατικά της οξείας και χρόνιας φλεγμονής και οι βασικές τους λειτουργίες
- Εικόνα 15:** Προτεινόμενη αναγωγή δυό ηλεκτρονίων του λιπιδικού υδροϋπεροξειδίου (LOOH) από την ομάδα θειοαιθέρα της μεθειονίνης.
- Εικόνα 16:** Σύνθεση της γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμικό και γλυκίνη
- Εικόνα 17:** Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH $\cdot$ ) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H)
- Εικόνα 18:** Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού (ABTS $^{+\cdot}$ ) μέσω της δράσης της περοξειδάσης
- Εικόνα 19:** Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS) -νικοτιναμιδοαδενινουκλεοτίδιο (NADH)
- Εικόνα 20:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίου (t-BHP)

- Εικόνα 21:** Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα
- Εικόνα 22:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα μυϊκά C2C12 και τα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα
- Εικόνα 23:** Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής
- Εικόνα 24:** Μονοπάτια μεταγωγής σήματος υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE
- Εικόνα 25:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2, της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1), της καταλάσης (CAT), της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) και της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) και της ενζυμικής δράσης της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης(GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Εικόνα 26:** Πειραματικός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου άσκησης
- Εικόνα 27:** Οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) με ταυτόχρονη μετατροπή του 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ
- Εικόνα 28:** Πειραματικός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου άσκησης

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1:** Ταξινόμηση και κύριες επιδράσεις των ελευθέρων ριζών
- Πίνακας 2:** Ιδιότητες των ισοενζύμων της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)
- Πίνακας 3:** Φυσικά χαρακτηριστικά και θέσεις στους ιστούς των πρωτεϊνών υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPX) σε ανθρώπους
- Πίνακας 4:** Οι τιμές IC<sub>50</sub> (mg of protein/ml) και RP<sub>0.5AU</sub> για την πρωτεΐνη βοδινού, την πρωτεΐνη σόγιας, την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος
- Πίνακας 5:** Θρεπτικά συστατικά του σκευάσματος υδατανθράκων-αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος
- Πίνακας 6:** Οι αιματολογικές μεταβλητές των συμμετεχόντων της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου στις 8 χρονικές στιγμές του πειράματος (mean ± SEM)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- Γράφημα 1:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της πρωτεΐνης βοδινού, της πρωτεΐνης σόγιας, της αιγοπρόβειας και της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH<sup>•</sup>) (A), στη ρίζα του 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS<sup>•+</sup>) (B), στη ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) (C) και στη ρίζα σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (D)
- Γράφημα 2:** Η αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης βοδινού, της πρωτεΐνης σόγιας, της αιγοπρόβειας και της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος
- Γράφημα 3:** Επιδράσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στη ζωτικότητα των (A) μυϊκών κυττάρων C2C12 και των (B) ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926
- Γράφημα 4:** Επιδράσεις του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλο υδροϋπεροξειδίου (tBHP) στη ζωτικότητα των (A) μυϊκών κυττάρων C2C12 και των (B) ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926
- Γράφημα 5:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH)
- Γράφημα 6:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH)
- Γράφημα 7:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) των μυϊκών κυττάρων C2C12 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της GSH από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B)
- Γράφημα 8:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της GSH από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B)
- Γράφημα 9:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS)
- Γράφημα 10:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS)
- Γράφημα 11:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των μυϊκών κυττάρων C2C12 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ROS από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B)
- Γράφημα 12:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ROS από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B)
- Γράφημα 13:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα (A) των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), (B) της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), (C) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και (D) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των μυϊκών κυττάρων C2C12

- Γράφημα 14:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα (A) των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), (B) της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), (C) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και (D) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926
- Γράφημα 15:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 16:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 17:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 18:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 19:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 20:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 21:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 22:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 23:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 24:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 25:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 26:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 27:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 28:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 29:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12
- Γράφημα 30:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926
- Γράφημα 31:** Επίδραση της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στην οξείδωση του λίπους και των υδατανθράκων κατά τη διάρκεια των 2 ωρών άσκησης (A) και κατά τη διάρκεια της 1 ώρας άσκησης μετά τη λήψη του κέικ (B)



**Γράφημα 32:** Οι επιδράσεις της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στις δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος του πλάσματος (TBARS) (A), στα πρωτεϊνικά καρβονύλια του πλάσματος (B), στη γλουταθειόνη (GSH) των ερυθροκυττάρων (C), στην καταλάση (CAT) των ερυθροκυττάρων (D) και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος (D)

**Γράφημα 33:** Πρότυπη καμπύλη της IL-6 (A) και της IL-10 (B)

**Γράφημα 34:** Οι επιδράσεις της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στην (A) ιντερλευκίνη (IL)-6 του πλάσματος, στην (B) ιντερλευκίνη (IL)-10 του πλάσματος και στην C- αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) του πλάσματος

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>ROS</b>	(Reactive Oxygen Species)	Δραστικές μορφές οξυγόνου
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	(Superoxide radicals)	Ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
<b>OH<sup>•</sup></b>	(Hydroxyl radicals)	Ρίζες υδροξυλίου
<b>RO<sup>•</sup></b>	(Alkoxy radicals)	Ρίζες αλκοξυλίου
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	(Hydroperoxyl radicals)	Ρίζες υδρουπεροξυλίου
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	(Hydrogen peroxide)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
<b>CCl<sub>3</sub><sup>•</sup></b>	(Trichloromethyl radicals)	Ρίζες τριχλωρομεθυλίου
<b>RS<sup>•</sup></b>	(Sulfur radicals)	Θειούχες ρίζες
<b>COCl</b>	(Hydrochlorous acid)	Υποχλωριώδες οξύ
<b>RNS</b>	(Reactive nitrogen species)	Δραστικές μορφές αζώτου
<b>NO<sup>•</sup></b>	(Nitrogen monoxide)	Μονοξείδιο του αζώτου
<b>NO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	(Nitrogen dioxide)	Διοξείδιο του αζώτου
<b>HNO<sub>2</sub></b>	(Nitrous oxide)	Νιτρώδες οξύ
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	(Peroxynitrite)	Υπεροξεινιτρικό
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	(Singlet oxygen)	Μονήρες οξυγόνο
<b>CoQ</b>	(Coenzyme Q)	Συνένζυμο Q
<b>PMN</b>	(Polymorphonuclear neutrophil)	Πολυμορφοουδετερόφιλα
<b>XO</b>	(Xanthine oxidase)	Οξειδάση της ξανθίνης
<b>ATP</b>	(Adenosine triphosphate)	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>ADP</b>	(Adenosine diphosphate)	Διφωσφορική αδενοσίνη
<b>AMP</b>	(adenosine monophosphate)	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
<b>NADPH</b>	β-Nicotinamide adenine di-nucleotide phosphate, reduced form	Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
<b>LOO<sup>•</sup></b>	(Lipid peroxy radical)	Ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου
<b>LOOH</b>	(Lipid hydroperoxides)	Λιπιδικά υδροϋπεροξείδια
<b>8-OHdG</b>	(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)	8-ύδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη
<b>SOD</b>	(Superoxide dismutase)	Υπεροξειδική δισμουτάση

<b>CAT</b>	(Catalase)	Καταλάση
<b>GP<sub>x</sub></b>	(Glutathione peroxidase)	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
<b>GR</b>	(Glutathione reductase)	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
<b>GSH</b>	(reduced form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
<b>GSSG</b>	(oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
<b>LDL</b>	(Low protein lipoprotein)	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
<b>O<sub>3</sub></b>	(Ozone)	Όζον
<b>MDA</b>	(Malondialdehyde)	Μαλονδιαλδεΐδη
<b>TBARS</b>	(Thiobarbituric Reactive Substances)	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
<b>TAC</b>	(Total Antioxidant Capacity)	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
<b>PLA<sub>2</sub></b>	(Phospholipase A <sub>2</sub> )	Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>
<b>PG</b>	(Prostaglandin)	Προσταγλανδίνη
<b>LK</b>	(Leukotriene)	Λευκοτριένια
<b>IL</b>	(Interleukin)	Ιντερλευκίνη
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	(Tumor necrosis factor- $\alpha$ )	Παράγοντας νέκρωσης όγκων- $\alpha$
<b>CRP</b>	(C-reactive protein)	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
<b>ICAM</b>	(Intercellular adhesion molecule)	Μεσοκυττάρια μόρια προσκόλλησης
<b>VCAM</b>	(Vascular cell adhesion molecule)	Αγγειακά μόρια προσκόλλησης
<b>CK</b>	(Creatine kinase)	Κρεατινική κινάση
<b>Mb</b>	(Myoglobin)	Μυοσφαιρίνη
<b>TGF</b>	(Transforming growth factor)	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
<b>HIF</b>	(Hypoxia-inducible factors)	Παράγοντας υποξίας
<b>eIF</b>	(Eucaryotic initiation factor)	Ευακρωτικοί παράγοντες έναρξης
<b>BCAA</b>	(Branched-chain amino acids)	Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας
<b>Ig</b>	(Immunoglobulin)	Ανοσοσφαιρίνη
<b>HPA</b>	(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis)	Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων
<b>GMP</b>	(Glycomacropeptide)	Γλυκομακροπεπίδιο
<b>BSA</b>	(Bovine serum albumin)	Αλβουμίνη ορού βοοειδών

<b>MBP</b>	(Milk basic protein)	Βασική πρωτεΐνη γάλακτος
<b>PICP</b>	(C-propeptide of type I procollagen)	C-προπεπτιδίο του προκολλαγόνου τύπου I
<b>DPPH</b>	(1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
<b>EDTA</b>	(Ethylenediaminetetraacetic acid)	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>TCA</b>	(Trichloroacetic acid)	Τριχλωροοξικό οξύ
<b>DTNB</b>	(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	5,5' δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
<b>DNPH</b>	(2,4-dinitrophenylhydrazine)	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
<b>TBA</b>	(2-thiobarbituric acid)	2-θειοβαβιτουρικό οξύ
<b>MDD</b>	(minimum detectable dose)	Ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση
<b>GSH</b>	(reduced form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
<b>GSSG</b>	(oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
<b>ABTS</b>	(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid)	2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase	
<b>NBT</b>	(Nitro Blue Tetrazolium)	Νιτροκυανό του τετραζολίου
<b>PMS</b>	(Phenazine methosulfate)	Μεθοσουλφονική φαιναζίνη
<b>tBHP</b>	(Tert-butyl-hydroperoxide)	Τριτ-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο
<b>DMEM</b>	(Dulbecco's modified Eagle's medium)	
<b>PBS</b>	(phosphate buffered saline)	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
<b>FBS</b>	(Fetal bovine serum)	Ορός εμβρύου μόσχου
<b>DCF-DA</b>	(2,7-dichlorofluorescein diacetate)	2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού
<b>NaOH</b>	(Sodium hydroxide)	Υδροξείδιο του νατρίου
<b>HUVEC</b>	(Human umbilical vein endothelial cell)	
<b>FC</b>	(Flow cytometry)	Κυτταρομετρία ροής
<b>FSC</b>	(Forward scattering)	Εμπρόσθια σκέδαση
<b>SSC</b>	(Side scattering)	Πλευρική σκέδαση
<b>μM</b>	(micromolar)	
<b>mM</b>	(millimolar)	

<b>Nrf2</b>	(Nuclear factor (erythroid-derived 2))	
<b>Keap1</b>	(kelch-like ECH-associated protein 1)	
<b>ARE</b>	(Antioxidant response element)	Αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης
<b>EpRE</b>	(Electrophile response element)	Ηλεκτρονιόφιλο στοιχείο απόκρισης
<b>GST</b>	(Glutathione-S-transferase)	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
<b>UDPGT</b>	(UDP-glucuronosyltransferases)	UDP-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση
<b>NQO1</b>	(NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1)	NAD(P)H:κινίνη οξειδωκτάσης
<b>EH</b>	(epoxide hydrolase)	Υδρολάση εποξειδίου
<b>AFAR</b>	(Aflatoxin B1 aldehyde reductase)	Αλδεϋδική ρεδοκτάση της αφλατοξίνης B1
<b>HO-1</b>	(Heme oxygenase 1)	Οξυγενάση της αίμης 1
<b>g-GCS</b>	(Gamma-glutamyl-cysteine-synthetase)	Συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης
<b>TR</b>	(Thioredoxine reductase)	Αναγωγή της θειορεδοξίνης
<b>SDS</b>	(Sodium dodecyl sulfate)	
<b>DTT</b>	(Dithiothreitol)	Διθειοθρεϊτόλη
<b>HEPES</b>	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	4 - (2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ
<b>APS</b>	(Ammonium persulfate)	Υπερθειϊκό αμμώνιο
<b>TEMED</b>	(Tetramethylethylenediamine)	Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
<b>DETAPAC</b>	(Diethylenetriaminepentaacetic acid)	Διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ
<b>CDNB</b>	(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)	1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	(Magnesium chloride)	Χλωριούχο μαγνήσιο
<b>NaCl</b>	(Sodium chloride)	Χλωριούχο νάτριο

## Περίληψη

Ο όρος “οξειδωτικό στρες” εισάχθηκε από τον Sies το 1991 ως “η διαταραχή της προοξειδωτικής (π.χ. ελεύθερες ρίζες) - αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ της πρώτης, που οδηγεί σε πιθανή βλάβη”. Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές ενώσεις που παράγονται φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Μπορούν να ασκήσουν τόσο θετικές επιδράσεις (π.χ. στο ανοσοποιητικό σύστημα) όσο και αρνητικές (π.χ. οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών ή DNA). Για τον περιορισμό αυτών των επιβλαβών επιπτώσεων, ο οργανισμός χρειάζεται ένα πολύπλοκο σύστημα προστασίας - το αντιοξειδωτικό σύστημα. Αυτό το σύστημα αποτελείται από αντιοξειδωτικά ένζυμα (CAT, GP<sub>x</sub>, SOD) και από μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη E, βιταμίνη A, βιταμίνη C, GSH και ουρικό οξύ). Η διαταραχή μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγεί σε μία οξειδωτική κατάσταση, που εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκίνος, ασθένεια Parkinson). Το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να αυξηθεί και κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες όπως η σωματική άσκηση.

Τα τελευταία χρόνια, σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η αντιοξειδωτική άμυνα και η προστασία του οργανισμού από τις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για αναζήτηση φυσικών πηγών αντιοξειδωτικών. Κάποιες πρωτεΐνες από συγκεκριμένα τρόφιμα έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν δραστικά είδη οξυγόνου. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα δημοφιλές διατροφικό συμπλήρωμα που ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα, πιθανώς λόγω του πλούσιου περιεχομένου της σε κυστεΐνη μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής της σε γλουταθειόνη. Ο ορός γάλακτος, ένα παραπροϊόν της παρασκευής τυριού και τυροπήγματος θεωρούνταν για αρκετό καιρό ένα προϊόν αποβλήτων αλλά τα τελευταία χρόνια περιγράφεται ως λειτουργικό τρόφιμο. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εξετάστηκαν οι πιθανές ευεργετικές επιδράσεις της πρωτεΐνης ορού γάλακτος τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> και OH<sup>•</sup>) *in vitro*. Μελετήθηκε, επίσης, η πιθανή αντιοξειδωτική δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Βρέθηκε ότι και στα δύο κυτταρικά συστήματα, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα της GSH και της TAC και μείωσε τα επίπεδα των ROS, των TBARS, των πρωτεϊνικών

καρβονυλίων και της GSSG. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η αντιοξειδωτική της δράση πιθανώς οφείλεται στο αυξημένο περιεχόμενο της σε κυστεΐνη μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής της σε γλουταθειόνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη στα κυτταρικά συστήματα C2C12 και EA.hy926, για τον προσδιορισμό του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση. Εξετάστηκε η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 καθώς και σε έναν αριθμό επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων, σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στα κύτταρα EA.hy926, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα του Nrf2, της SOD-1, της HO-1 και της CAT καθώς και την ενζυμική δράση της CAT, της SOD και της GST. Στα κύτταρα C2C12, τα επίπεδα του Nrf2 δεν επηρεάστηκαν ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα της SOD-1, της HO-1, της CAT και της GCS καθώς η ενζυμική δράση της CAT, της SOD και της GST. Τέλος, βρέθηκε ότι ένα σκεύασμα σε μορφή κέικ που περιέχει αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος, μείωσε τα επίπεδα των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) και εμφάνισε αντι-φλεγμονώδη δράση, καθώς οδήγησε σε μείωση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6, της πρωτεΐνης οξείας φάσης CRP και αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 μετά από εξαντλητική άσκηση σε ανθρώπους.

## Abstract

The term ‘‘oxidative stress’’ was introduced by Sies in 1991 as ‘‘a disturbance in the prooxidant (e.g. free radicals) – antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage. Free radicals are reactive compounds that are naturally produced in the human body. They can exert positive effects (e.g. on the immune system) or negative effects (e.g. lipids, proteins or DNA oxidation). To limit these harmful effects, an organism requires complex protection – the antioxidant system. This system consists of antioxidant enzymes (CAT, GP<sub>x</sub>, SOD) and non-enzymatic antioxidants (e.g. vitamin E, vitamin A, vitamin C, GSH and uric acid). An imbalance between free radical production and antioxidant defence leads to an oxidative stress state, which may be involved in aging processes and even in some pathology (e.g. cancer and Parkinson’s disease). Oxidative stress can also be increased under physiological conditions such as physical exercise.

In recent years, in an effort to increase the antioxidant defense and protection of the body from the harmful effects of oxidative stress, there is an increased interest in finding natural sources of antioxidants. Some proteins from certain foods have been shown to have the ability to neutralize reactive oxygen species. Whey protein is a popular nutritional supplement which enhances the antioxidant defense, probably due to its rich cysteine content through intracellular conversion into glutathione. Whey, a by product of cheese manufacturing, was considered for a long time a waste product but in recent years is described as a functional food. In the present study, the potential beneficial effects of whey protein were examined both *in vitro* and *in vivo*. It was found that sheep whey protein exhibited scavenging activity against free radicals (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> και OH<sup>•</sup>) *in vitro*. Furthermore, it was studied the antioxidant activity of sheep whey protein in muscle cells C2C12 and endothelial cells EA.hy926. It was found that in both cell systems, whey protein increased GSH and TAC levels and decreased ROS, TBARS, protein carbonyls and GSSG levels. Thus, the results indicate that sheep whey protein exhibits strong antioxidant activity both *in vivo* and *in vitro*. The antioxidant activity of whey protein is probably due to the rich cysteine content that is converted intracellularly to glutathione. Finally, it was conducted a study in the C2C12 and EA.hy926 cells to determine the molecular mechanism through which whey protein exerts its antioxidant action. It was examined



the effects of sheep whey protein on the transcription factor Nrf2 and on a number of antioxidant enzymes regulated by this factor. In EA.hy926 cells, it was found that whey protein increased Nrf2, SOD-1, HO-1 and CAT levels as well as the enzymatic activity of CAT, SOD and GST. In C2C12 cells, the Nrf2 levels were not affected while the levels of SOD-1, HO-1, CAT and GCS as well as the enzymatic activity of CAT, SOD and GST were increased. Thus, the results show that the molecular mechanism through which whey protein enhances the antioxidant capacity is cell specific, and it may be either Nrf2-dependent or Nrf2-independent. Finally, it was found that a supplement in a cake form containing sheep whey protein, reduced TBARS levels (a marker of lipid peroxidation) and exhibited anti-inflammatory activity, as it reduced the proinflammatory cytokine IL-6, the acute phase protein CRP and increased the anti-inflammatory protein IL-10 after exhaustive exercise in humans.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

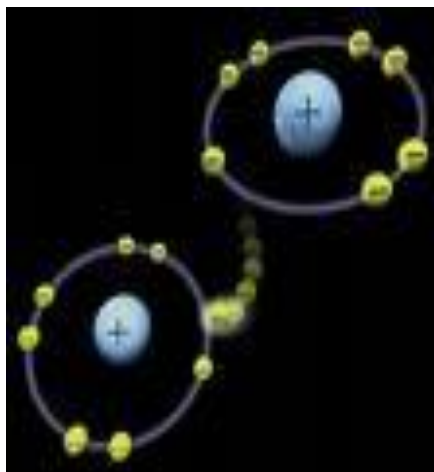
---

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

# 1. Ελεύθερες Ρίζες

## 1.1. Γενικά

Με τον όρο “ελεύθερες ρίζες” αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Halliwell & Gutteridge, 1999) (Εικόνα 1). 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 πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Sen, 2001; Prior & Cao, 1999).



**Εικόνα 1:** Δομή ελεύθερης ρίζας

Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός (κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα) (Πίνακας 1). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater, 1993).

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 (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).

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. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), 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 υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3\cdot$ ), οι θειούχες ρίζες ( $RS\cdot$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξειδίο του αζώτου ( $NO\cdot$ ) και το διοξειδίο του αζώτου ( $NO_2\cdot$ ) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες [π.χ. το νιτρώδες οξύ ( $HNO_2$ ) και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ( $ONOO^-$ )] (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση και κύριες επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.

Ελεύθερη Ρίζα		Χρόνος ημιζωής	Κύριες επιδράσεις
<b>Δραστικές μορφές οξυγόνου</b>	<b>ROS</b>	$10^{-5}$ sec	Οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, DNA βλάβη
Ανιόν σουπεροξειδίου	$O_2\cdot^-$	Stable	
Όζον	$O_3$	1μsec	
Μονήρες οξυγόνο	$^1O_2$	$10^{-9}$ sec	
Ρίζα υδροξυλίου	$OH\cdot$	Stable	
Υπεροξειδίο υδρογόνου	$H_2O_2$	Stable	
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$	$10^{-6}$ sec	
Ρίζα αλκοξυλίου	$RO\cdot$	7 sec	
Ρίζα υπεροξυλίου	$RO_2\cdot$		
Ρίζα υδρουπεροξυλίου	$RO_2H\cdot$		
<b>Δραστικές μορφές αζώτου</b>	<b>RNS</b>		Οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, DNA βλάβη
Μονοξειδίο αζώτου	$NO\cdot$		
Διοξειδίο αζώτου	$NO_2\cdot$	1-10 sec	
Νιτρικό υπεροξειδίο	$ONOO\cdot$	0.05	
<b>Δραστικές μορφές θείου</b>	<b>RSS</b>		Οξείδωση πρωτεϊνών, DNA βλάβη, παραγωγή ROS
Ρίζα θείου	$RS\cdot$		

## 1.2. Κύρια Δραστικά Είδη Ελευθέρων Ριζών

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

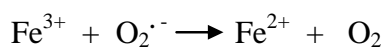
Το σουπεροξειδίο αρχικά σχηματίζεται σαν ένα ενδιάμεσο βιοχημικών αντιδράσεων (Halliwell, 1995). Αυτό το ανιόν είναι αρνητικά φορτισμένο και είναι σχετικά αδιαπέραστο στη μεμβράνη.

Σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα  $e^-$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$

Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο  $O_2$  από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου. Επίσης, κύτταρα φλεγμονής παράγουν σχετικά μεγάλες ποσότητες σουπεροξειδίου, σαν μέρος της διαδικασίας κατά την οποία αντιστέκονται στην εισβολή μικροοργανισμών (Fuchs, 1992). Μικρότερες ποσότητες  $O_2^{\cdot-}$  παράγονται σαν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ινοβλαστών. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ.

### 1.2.2. Ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ )

Η δραστηριότητα της ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

### 1.2.3. Μονήρες οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ )

Το  $^1\text{O}_2$  (singlet oxygen) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη) και αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το  $^1\text{O}_2$  σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

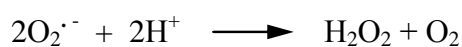
### 1.2.4. Υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton



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

SOD



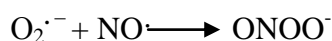
### 1.2.5. Μονοξειδίο του αζώτου (NO·)

Το μονοξειδίο του αζώτου συντίθεται από το αμινοξύ L-αργινίνη σε πολλούς τύπους κυττάρων. Η σύνθεση συμβαίνει μέσω των συνθετασών του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Υπάρχουν τρεις τύποι συνθετασών: η νευρωνική NOS (NOS1), η οποία αρχικά βρέθηκε στον νευρικό ιστό αλλά είναι επίσης παρούσα στους περισσότερους τύπους κυττάρων; η ενδοθηλιακή NOS (NOS3) και η επαγωγίμη NOS (NOS3) που κυρίως βρίσκεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι NOS μετατρέπουν την L-αργινίνη σε NO και L-κιτρουλλίνη χρησιμοποιώντας την NADPH.

Το NO είναι ένας ασθενής αναγωγικός παράγοντας, αντιδρά με το O<sub>2</sub> για να σχηματίσει NO<sub>2</sub> και αντιδρά ραγδαία με το O<sub>2</sub><sup>·-</sup> προς το σχηματισμό ONOO<sup>-</sup> (Halliwell, 1994).

### 1.2.6 Υπεροξεινιτρικό (ONOO<sup>-</sup>)

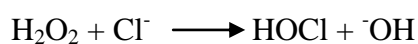
Η αντίδραση του O<sub>2</sub><sup>·-</sup> με το NO προς τον σχηματισμό ONOO<sup>-</sup> συμβαίνει τρεις φορές γρηγορότερα από την αυτοοξειδοαναγωγή O<sub>2</sub><sup>·-</sup> προς παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και ακόμη πιο γρήγορα από την αντίδραση του NO με πρωτεΐνες της αίμης.



Το ONOO<sup>-</sup> είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των ομάδων θειόλης, βλάβη στο DNA και σε νίτρωση των πρωτεϊνών.

### 1.2.7. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ σχηματίζεται από τη δράση της μυελοπεροξειδάσης χρησιμοποιώντας υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το υπερχλωριώδες κατά κύριο λόγο προέρχεται από ουδετερόφιλα και μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε διάφορα μακρομόρια οξειδώνοντας τις θειόλες, τα λιπίδια, το ασκορβικό και την NADPH (Halliwell & Gutteridge, 2007). Επιπλέον, στην όξινη μορφή του, αυτό το οξειδωτικό μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλέσει κατακερματισμό και συσσωμάτωση πρωτεϊνών (Halliwell & Gutteridge, 2007).



### 1.3. Πηγές Παραγωγής Ελευθέρων Ριζών

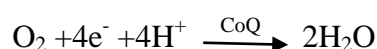
Υπάρχουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

#### 1.3.1. Ενδογενείς πηγές

Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν εκείνες που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργώντας μέσα στο κύτταρο και εκείνες που σχηματίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή.

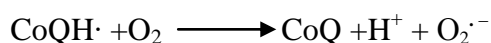
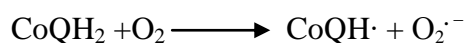
##### 1.3.1.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ο μεταβολισμός του οξυγόνου που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, γενικά θεωρείται ότι σχετίζεται με την παραγωγή ROS (Di Meo & Venditti, 2001). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση οδηγεί στο σχηματισμό τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Οξείδωση του υποστρώματος συμβαίνει στον κύκλο του Krebs' και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, με το οξυγόνο να έχει το ρόλο του δέκτη ηλεκτρονίων. Στην αναπνευστική αλυσίδα 95-99% του οξυγόνου που καταναλώνεται ανάγεται σε νερό (H<sub>2</sub>O) από το συνένζυμο Q (CoQ) (Fehrenbach & Northoff, 2001).

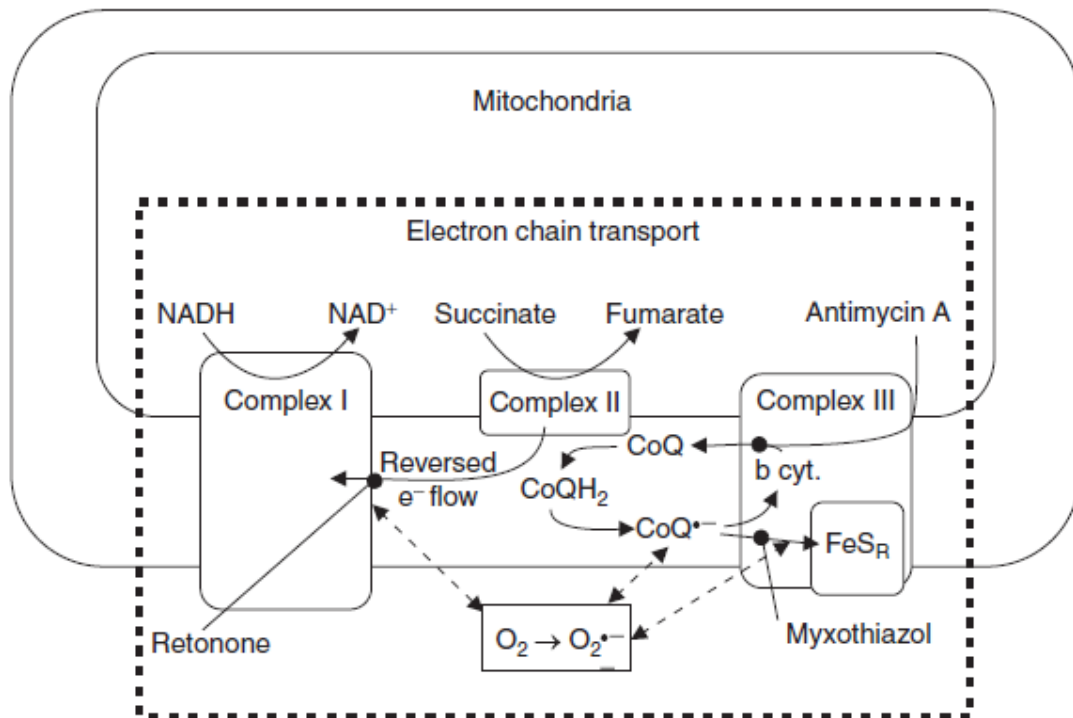


Ωστόσο, 1-5% του O<sub>2</sub> θα οδηγήσει στο σχηματισμό O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Ο σχηματισμός ROS είναι ανάλογος με τη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας (Di Meo & Venditti, 2001).

Δύο κύριες θέσεις παραγωγής ROS έχουν εντοπιστεί στην αναπνευστική αλυσίδα: το σύμπλεγμα I και το σύμπλεγμα III (Sjodin et al., 1990; Lenaz, 1998). Στο σύμπλεγμα I, η κύρια θέση διαρροής ηλεκτρονίων στο οξυγόνο φαίνεται να είναι τα συμπλέγματα σιδήρου-θείου και στο σύμπλεγμα III φαίνεται να είναι η Q<sub>10</sub> ημικινόνη (Muller et al., 2004). Στο εσωτερικό των συμπλεγμάτων I και III, το ανηγμένο συνένζυμο Q<sub>10</sub> συμβάλλει στο σχηματισμό ROS. Το CoQ μπορεί να μετατραπεί σε “δημιουργό” O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, όταν το ανιόν ημιουβικινόνης (QH<sup>·</sup>) που προέρχεται από την οξείδωση της ουβικινόλης, γίνεται προσβάσιμο σε πρωτόνια (Lenaz et al., 2000).







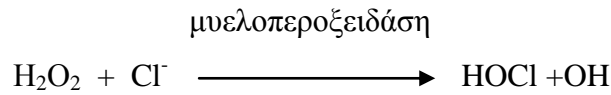
**Εικόνα 2:** Πιθανές θέσεις σχηματισμού ROS στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. **b cyt.**= κυτόχρωμα b; **CoQ** = συνένζυμο Q; **CoQH<sub>2</sub>** = ανημένο συνένζυμο Q<sub>10</sub>; **CoQ<sup>•</sup>** = οξειδωμένο συνένζυμο Q<sub>10</sub>; **FeS<sub>R</sub>** = Rieske πρωτεΐνη σιδήρου-θείου; **NAD<sup>+</sup>** = οξειδωμένο νικοτιναμίδο-αδενινονουκλεοτίδιο; **NADH** = ανηγμένο νικοτιναμίδο-αδενινονουκλεοτίδιο; **O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** = ιόν σουπεροξειδίου.

### 1.3.1.β. Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

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

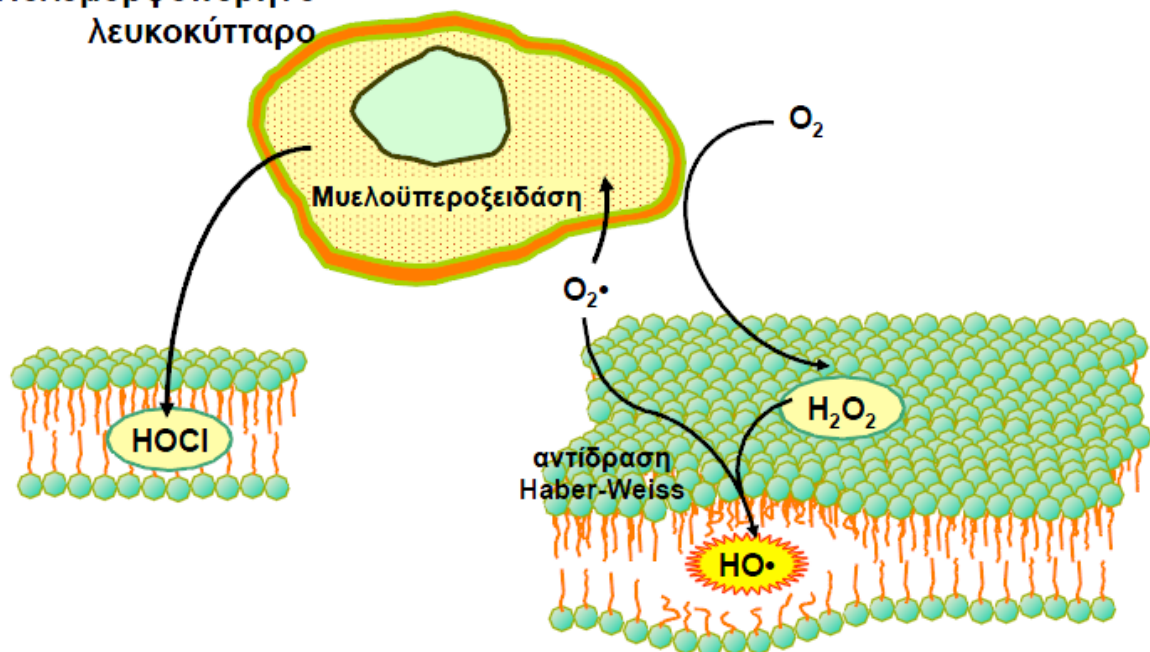
Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα και το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης.

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



Αν και αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιικής μόλυνσης, ROS και άλλα οξειδωτικά που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani and Evans, 1979; Meydani et al., 1992).

### Πολυμορφοπύρηνο Λευκοκύτταρο

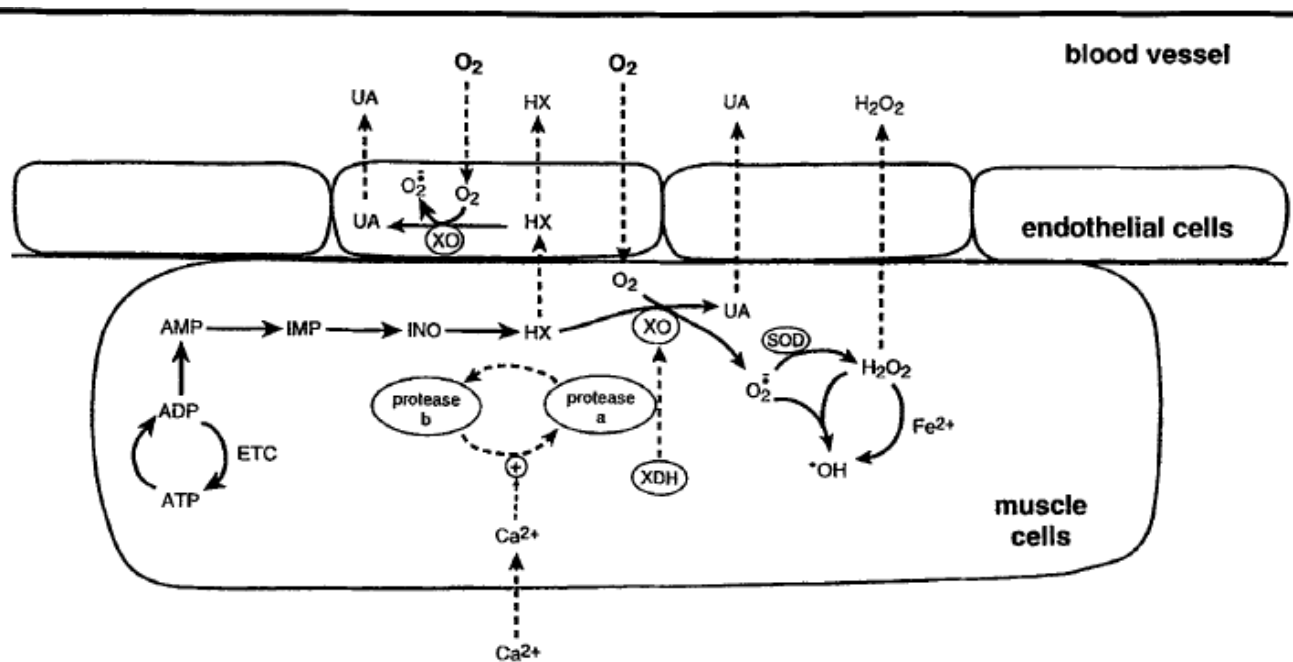


**Εικόνα 3:** Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) από την επιστράτευση των πολυμορφοουδετερόφιλων (PMN) στο εσωτερικό του κυττάρου.  $O_2^{\cdot-}$  = ρίζα σουπεροξειδίου,  $OH^{\cdot}$  = ρίζα υδροξυλίου,  $H_2O_2$  = υπεροξειδίο του υδρογόνου,  $HOCl$  = υποχλωριώδες οξύ,  $O_2$  = οξυγόνο.

### 1.3.1.γ. Οξειδάση της ξανθίνης

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kurppasamy and Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) απαμινώνεται σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή, το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^{\cdot-}$ .

Η XO πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το  $Ca^{2+}$  ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.



**Εικόνα 4:** Ο ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. ETC= αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων; HX= υποξανθίνη; UA=ουρικό οξύ; XDH= δεϋδρογονάση της ξανθίνης, UA = ουρικό οξύ, ETC = αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ATP = τριφωσφορική αδενοσίνη, ADP = διφωσφορική αδενοσίνη, AMP = μονοφωσφορική αδενοσίνη,  $O_2^{\cdot-}$  = ρίζα σουπεροξειδίου,  $\cdot OH$ = ρίζα υδροξυλίου,  $H_2O_2$  = υπεροξειδίο του υδρογόνου

### 1.3.1.δ. Κυτόχρωμα P<sub>450</sub>

Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα του ήπατος παράγουν ελεύθερες μορφές οξυγόνου μέσω του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> (Yu, 1994).

Το NADPH οξειδώνεται δημιουργώντας O<sub>2</sub><sup>·-</sup> το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe<sup>3+</sup>, η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O<sub>2</sub> παράγοντας O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Η NADPH οξειδάση βρίσκεται, εκτός από την μεμβράνη του πλάσματος και σε άλλα κυτταρικά συστατικά όπως τα μιτοχόνδρια.

### 1.3.1.ε Αυτοοξείδωση μορίων

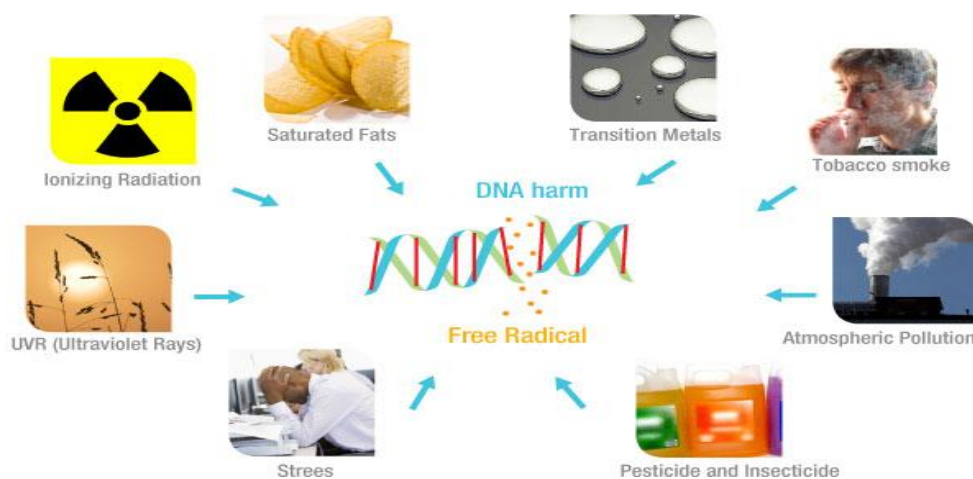
Ορισμένα μόρια όπως φλαβόνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.

### 1.3.2. Εξωγενείς πηγές

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

Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000).

Σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



**Εικόνα 5:** Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

## **1.4.Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου**

### **1.4.1. Θετικές επιδράσεις**

Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των κυττάρων (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaud et al., 2006). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ενζυμική ενεργοποίηση, την αποτοξικοποίηση φαρμάκων και την αναπλήρωση του γλυκογόνου (Jenkins, 1988). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

### **1.4.2. Αρνητικές επιδράσεις**

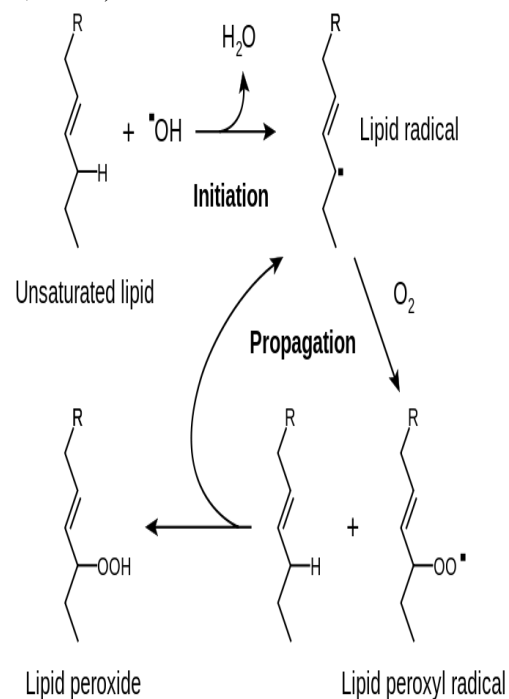
Παρά τις επωφελείς επιδράσεις, οι ROS έχουν και κάποιες αρνητικές επιδράσεις καθώς αλλάζουν το μέγεθος και το σχήμα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν (Cooper et al., 2002). Συνεπώς, οι ROS μπορούν να επάγουν την απόπτωση σε υγιή κύτταρα, να προκαλέσουν φλεγμονή και να αλλοιώσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως καταρράκτης, καρκίνος, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer και καθώς και γήρανση (Golden et al., 2002).

Επίσης, οι ROS προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA).

**Λιπίδια:** Τα λιπίδια των μεμβρανών που είναι παρόντα σε υποκυτταρικά οργανίδια, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβη προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες. Τα λιπίδια όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να υποβληθούν σε μια εξαιρετικά επιζήμια αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης, οδηγώντας τόσο σε άμεσες όσο και σε έμμεσες επιπτώσεις. Κατά τη διάρκεια της λιπιδικής υπεροξειδωσης ένας μεγάλος αριθμός τοξικών παραπροϊόντων σχηματίζονται, τα οποία συμπεριφέρονται ως “δεύτεροι αγγελιοφόροι” και δρουν σε περιοχές μακριά από τη θέση παραγωγής

τους. Η βλάβη που προκαλείται από τη λιπιδική υπεροξειδωση είναι ιδιαίτερα επιζήμια για τη λειτουργία του κυττάρου (Devasagayam et al., 2003).

Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μία διαδικασία μεσολαβούμενη από ελεύθερες ρίζες. Η έναρξη της υπεροξειδικής αλληλουχίας οφείλεται στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αποσπών ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου (CH<sub>2</sub>), αφήνοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο άτομο άνθρακα (•CH). Η προκύπτουσα ρίζα άνθρακα σταθεροποιείται με μοριακή μετάθεση παράγοντας ένα συζευγμένο διένιο, το οποίο αντιδρά με ένα μόριο οξυγόνου σχηματίζοντας μια ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου (LOO•). Αυτές οι ρίζες αποσπών άτομα υδρογόνου από άλλα μόρια λιπιδίων σχηματίζοντας λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH) (Εικόνα 6).



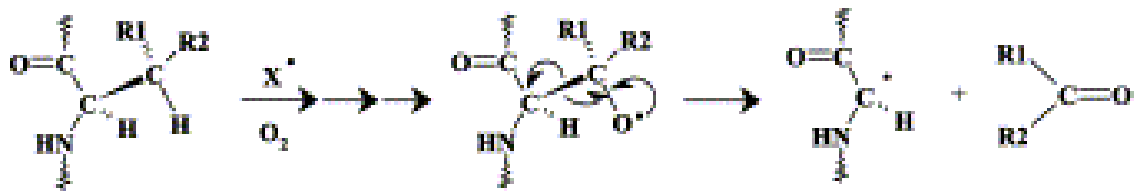
**Εικόνα 6:** Στάδια λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Η λιπιδική υπεροξειδωση αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειώνει την ικανότητα διατήρησης μιας εξισσοροπημένης βαθμίδας συγκέντρωσης και αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τη φλεγμονή (Radak et al., 1999). Συνεπώς, είναι πιθανό να εντοπίσουμε απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, μείωση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αλλαγές στις μιτοχονδριακές λειτουργίες (Jackson & O'Farrell, 1993).

**Πρωτεΐνες:** Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν τόσο πρωτεΐνες αίματος όσο και δομικές πρωτεΐνες και να αναστείλουν το πρωτεολυτικό σύστημα (Szweda et al., 2002). Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν αμινοξέα ή να κατακερματιστούν. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Stadtman, 1986).

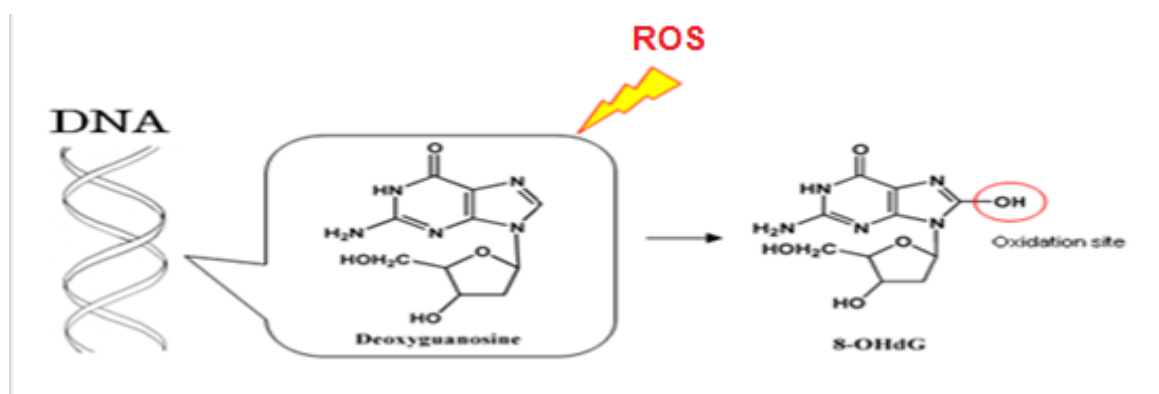
Η οξειδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αυξήσεις στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Renke et al., 2000; Levine, 2002 και οξειδωμένων αμινοξέων (Leewenburgh et al., 1999; Stadtman & Levine, 2000). Οι ROS έχουν επίσης την ικανότητα να αλλάζουν το λυσοσωμικό σύστημα και το

πρωτεάσωμα, δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Szweda et al., 2002).



**Εικόνα 7:** Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης.

**DNA:** Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγή στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) αντιδρά με τη γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυ-2'-γουανοσίνη (8-OHdG) (Εικόνα 8). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να αντιδράσουν και με άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων τέτοιων προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002q Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).

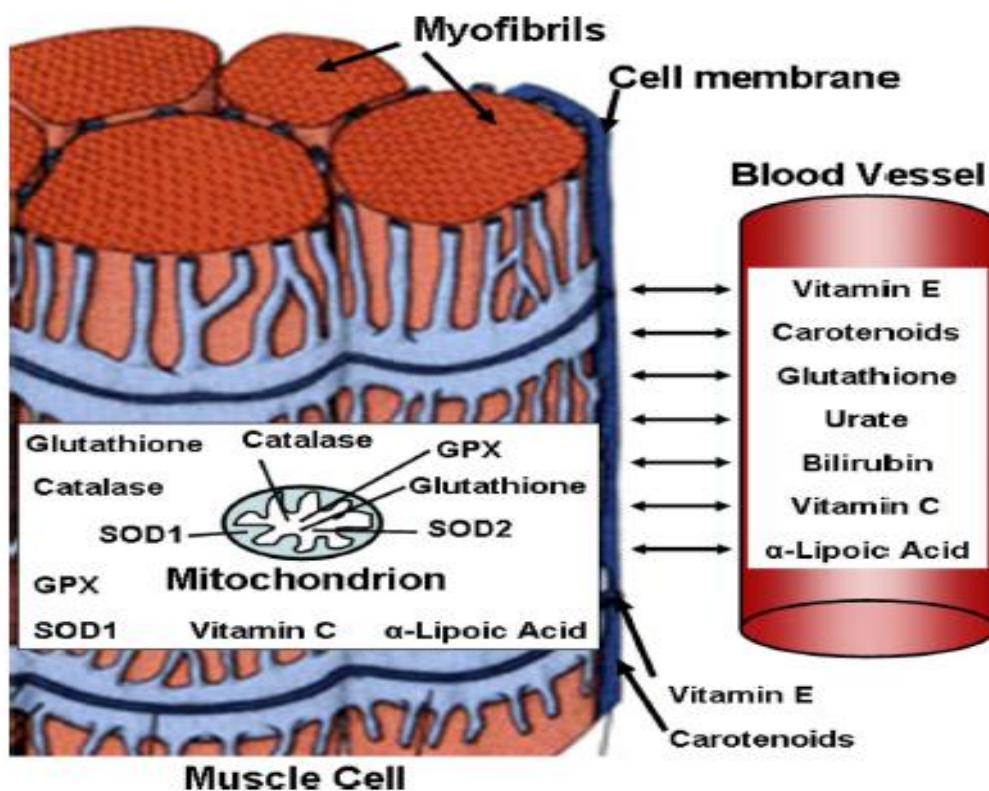


**Εικόνα 8:** Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) προς σχηματισμό 8-υδροξυδιογουανοσίνης (8-OHdG).



### 1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό, ορίζεται η ουσία που βοηθάει στη μείωση της σοβαρότητας του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (Dekkers et al., 1996). Ένας αριθμός αντιοξειδωτικών είναι ενεργά στον οργανισμό και συμπεριλαμβάνουν τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (Powers & Lennon, 2000). Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ( $GP_x$ ) και την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Τα μη ενζυμικά συμπεριλαμβάνουν τη βιταμίνη A (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη E (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες [γλουταθειόνη (GSH), ουρικό οξύ, συνένζυμο  $Q_{10}$ , φερριτίνη, χολερυθρίνη] και μικροσυστατικά (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.



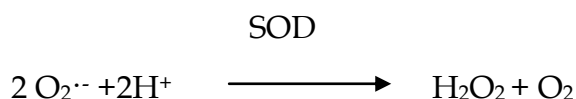
**Εικόνα 9:** Θέσεις των πρωτογενών ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών σε μυϊκά κύτταρα. **GPX**= υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, **SOD1**= υπεροξειδική δισμουτάση 1, **SOD2**=υπεροξειδική δισμουτάση 2.



### 1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

#### 1.5.1.α. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες σουπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$  :



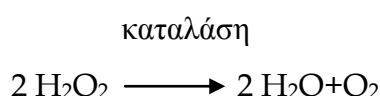
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (SOD1, SOD2, SOD3) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος σουπεροξειδίου (Culotta et al., 2006; Suzuki et al., 2000). Δύο από τις ισομορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Suzuki et al., 2000). Η SOD1 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η SOD2 χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η SOD3 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Ιδιότητες των ισοενζύμων της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).

Ιδιότητες	SOD1	SOD2	SOD3
Κυτταρική θέση	Κυτοσόλιο και μιτοχονδριακός ενδιάμεσος χώρος	Μιτοχονδριακή μήτρα	Εξωκυττάριος χώρος
Μέταλλο	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Cu, 1 Zn
Μοριακό βάρος,kDa	32.5	24.7	30
Υπομονάδα	Διμερές	Τετραμερές	Τετραμερές
Αναστολή από $CN^-$	Ναι	Όχι	Ναι
Αναστολή από $H_2O_2$	Ναι	Ναι	Ναι
Σταθερά ρυθμού αντίδρασης με $O_2^{\cdot-}$	$0.62 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$	$0.72 \times 10^9$

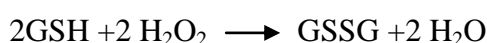
### 1.5.1.β. Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιδιαίτερα στα υπεροξειδιοσωμάτια, κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο με σκοπό να αποτοξικοποιήσουν τοξικές ουσίες και παράγουν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Antunes et al., 2002). Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



### 1.5.1.γ. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP<sub>x</sub>)

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1-GPX5, Πίνακας 3) (Brigelius-Flohe, 2006; Drevet, 2006). Η GP<sub>x</sub> καταλύει την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή του οργανικού υδροϋπεροξειδίου (ROOH) σε νερό (H<sub>2</sub>O) και αλκοόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την GSH ή σε κάποιες περιπτώσεις τηνθειορεδοξίνη ή την γλουταρεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων (Bjornstedt et al., 1997; Callahan et al., 2001). Όταν η GSH είναι ο δότης ηλεκτρονίων, οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης



Αν και οι παραπάνω αντιδράσεις που καταλύονται από όλα τα είδη της GP<sub>x</sub> είναι οι ίδιες, η κάθε μορφή GP<sub>x</sub> διαφέρει ως προς την ειδικότητα του υποστρώματος και την κυτταρική θέση (Brigelius-Flohe, 1999). Η ποικιλία στην ειδικότητα των υποστρωμάτων και την κυτταρική θέση καθιστούν την GP<sub>x</sub> ως ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Το γεγονός ότι πολλά ισόένζυμα GP<sub>x</sub> ανάγουν μια μεγάλη ποικιλία υδροϋπεροξειδίων, κάνει την GP<sub>x</sub> ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων από βλάβες προερχόμενες από ROS.

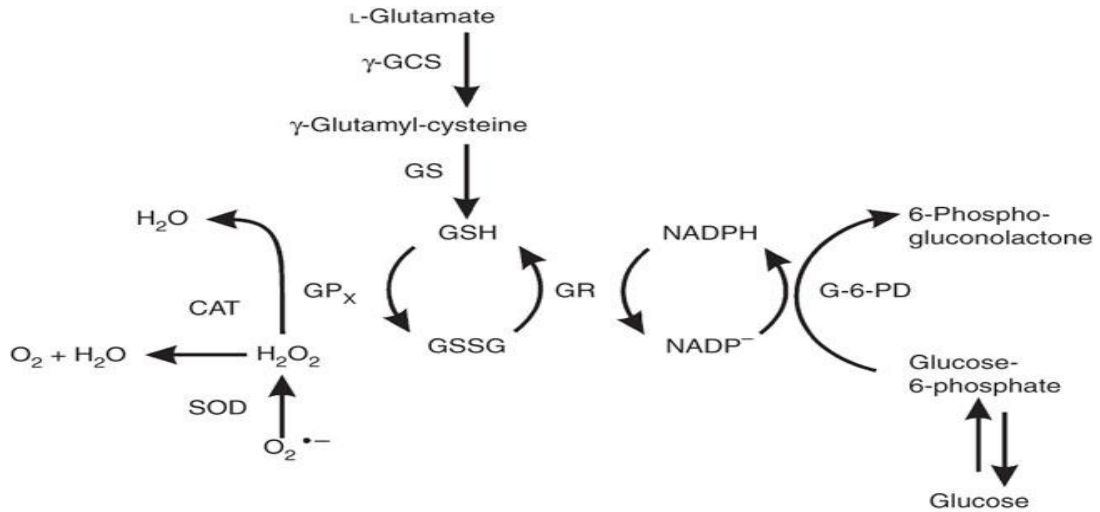
**Πίνακας 3:** Φυσικά χαρακτηριστικά και θέσεις στους ιστούς των πρωτεϊνών υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPX) σε ανθρώπους.

<b>Ιδιότητα</b>	<b>GP<sub>x</sub> 1</b>	<b>GP<sub>x</sub> 2</b>	<b>GP<sub>x</sub> 3</b>	<b>GP<sub>x</sub> 4</b>	<b>GP<sub>x</sub> 5</b>
<b>Κυτταρική θέση</b>	Κυτοσόλιο,Μιτοχόνδρια	Κυτοσόλιο	Κυτοσόλιο,Εξωκυττάριος χώρος	Μιτοχόνδρια	Εξωκυττάριος χώρος
<b>Υπομονάδα</b>	Τετραμερές	Τετραμερές	Τετραμερές	Μονομερές	Διμερές
<b>Μοριακό βάρος, kDa</b>	21	22	22.5	19	24
<b>Ιστός</b>	Όλοι οι ιστοί	Στομάχι,Έντερο	Όλοι οι ιστοί	Καρδιά,Εγκέφαλος	Ήπαρ,Νεφροί

#### **1.5.1.δ. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)**

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς 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 ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.

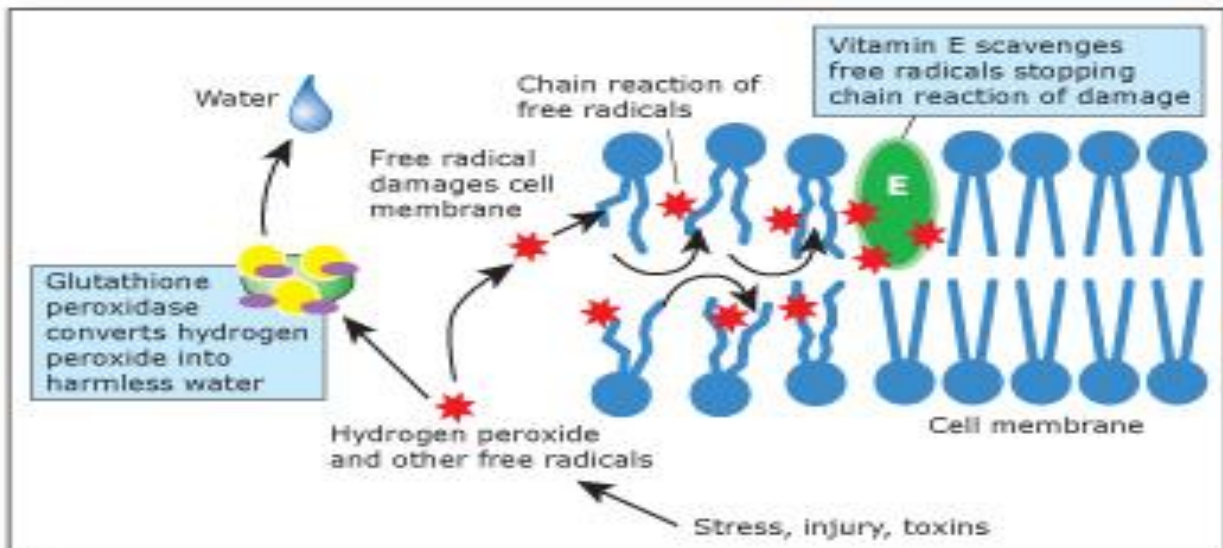


**Εικόνα 10:** Απεικόνιση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). **GP<sub>x</sub>** = υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, **GR** = αναγωγή της γλουταθειόνης, **GSSG** = οξειδωμένη γλουταθειόνη, **GSH** = ανηγμένη γλουταθειόνη, **γ-GCS** = γ-γλουτάμυλο-κυστεΐνη, **NADPH** = νικοτινάμιδο δινουκλεοτιδικό φωσφορικό.

## 1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

### 1.5.2.α. Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη Ε είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από πολλές ισομορφές, γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή (Fuchs et al., 2003). Η βιταμίνη Ε είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό λόγω της αφθονίας της στα κύτταρα και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και λόγω της ικανότητάς της να αντιδρά απευθείας με τις ROS (Evans, 2000). Αλληλεπιδρά με πολυάριθμα αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, GSH, β-καροτένιο ή λιποϊκό οξύ, τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τη βιταμίνη Ε από την οξειδωμένη της μορφή (Coombes et al., 2001). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον, ιδιαίτερα τις ρίζες υπεροξυλίου που προέρχονται από την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) (Vasankari et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001).



**Εικόνα 11:** Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τη βιταμίνη E.

### 1.5.2.β. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά αλλά είναι αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). Η βιταμίνη C είναι πιο άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Στα εξωκυττάρια υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{LOO}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ ) (Bigard, 2001). Η βιταμίνη C έχει επίσης την ικανότητα να παγιδεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή οξειδωτική δράση.

### 1.5.2.γ. Β-καροτένιο και βιταμίνη A (ρετινόλη)

Η βιταμίνη A είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS (ιδιαίτερα το  $^1\text{O}_2$  και λιπιδικές ρίζες) και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Powers & Lennon, 2000; Ozhogina & Kasaikina, 1995). Αν και λιγότερο σημαντική από τη βιταμίνη E, η βιταμίνη A και το β-καροτένιο ενεργούν από κοινού με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E με σκοπό να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις ROS (Livrea et al., 1995).

#### 1.5.2.δ. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό (Willcox et al., 2002; Wedworth & Lynch, 1995). *In vitro* μελέτες έχουν τονίσει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλουν 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.

#### 1.5.2.ε. Γλουταθειόνη (GSH)

Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση (Meister & Anderson, 1983). Η GSH ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την  $GP_x$ , εξουδετερώνει την  $OH\cdot$  και το  $^1O_2$  και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξείδωση (Niki et al., 1985).

Η GSH εκτός από αντιοξειδωτική δράση επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες:

1. Η GSH συζεύγνυται με το NO για να σχηματίσει S-νιτροζογλουταθειόνη, το οποίο διασπάται από το σύστημα θειορεδοξίνης για να απελευθερώσει GSH και NO (Fang et al., 2002).
2. Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την αφυδρογονάση της φορμαλδεΐδης, η οποία μετατρέπει την φορμαλδεΐδη και την GSH σε S-φόρμυλο-γλουταθειόνη (Townsend et al., 2003). Η απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης (ένα καρκινογόνο) είναι φυσιολογικής σημασίας επειδή παράγεται από το μεταβολισμό της μεθειονίνης, της χολίνης, της μεθανόλης, της σαρκosίνης και των ξενοβιοτικών ουσιών.
3. Η GSH είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της προσταγλανδίνης  $H_2$  σε προσταγλανδίνες  $D_2$  και  $E_2$  από την ισομεράση του ενδοϋπεροξειδίου (Lu, 2000).
4. Η GSH συμμετέχει στο σύστημα της γλυοξυλάσης, η οποία μετατρέπει την μεθυλογλυοξυλάση σε D-γαλακτικό, ένα μονοπάτι δραστικό σε μικροοργανισμούς.

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Aw, 2003). Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών.

Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.

#### **1.5.2.στ. Συνένζυμο Q<sub>10</sub>**

Το συνένζυμο Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002; Maulic et al., 2000). Το CoQ<sub>10</sub> είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Witt et al., 1992; Crane, 2001). Το CoQ<sub>10</sub> έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

#### **1.5.2.ζ. Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους (Svensson et al., 2002; Grootveld & Haliwell, 1987; Hellsten et al., 1997). Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες (Hellsten et al., 1998). Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO<sup>-</sup> ή το όζον (O<sub>3</sub>) (Ames et al., 1981; Wayner et al., 1987; Hooper et al., 1998, 2000; Kean et al., 2000). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι (>50%) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al., 1987). Έτσι, το ουρικό οξύ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον Fe<sup>3+</sup> να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση (Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1991).

### 1.5.2.η. Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της πρωτεΐνης της αίμης. Η οξυγενάση της αίμης διασπά τον δακτύλιο της αίμης προς σχηματισμό χολοπρασίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από τη ρεδοκτάση της χολοπρασίνης σε χολερυθρίνη (Stocker, 2004). Αν και τόσο η χολερυθρίνη όσο και η χολοπρασίνη είναι αναγωγικά είδη, η χολερυθρίνη θεωρείται το καλύτερο φυσιολογικό αντιοξειδωτικό (Baranano et al., 2002). Πράγματι, η χολερυθρίνη κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικά επίπεδα του  $H_2O_2$  (Baranano et al., 2002; Stocker et al., 1987).

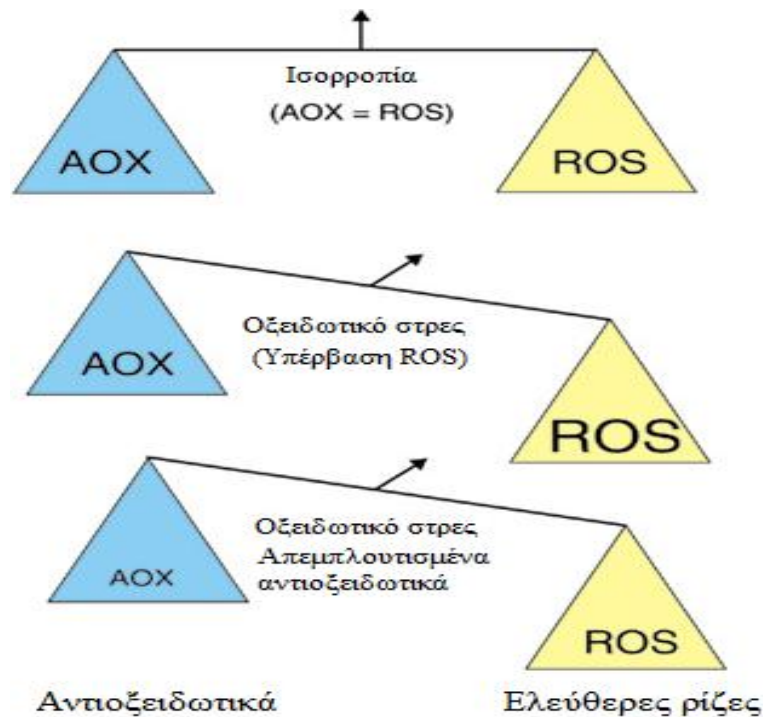
### 1.6. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση σοβαρής ανισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Ο Sies, ο οποίος εισήγαγε τον όρο από τον τίτλο του βιβλίου που εκδόθηκε το 1985, πρότεινε έναν ορισμό το 1991 στην εισαγωγή της δεύτερης έκδοσης ως “η διαταραχή ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε ενδεχόμενη βλάβη” (Εικόνα 12).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από:

1. Μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, π.χ. μεταλλάξεις επηρεάζουν ένζυμα αντιοξειδωτικής άμυνας (CuZnSOD, MnSOD, GSHPX) ή τοξικοί παράγοντες εξαντλούν τέτοιες άμυνες. Για παράδειγμα, πολλά ξеноβιοτικά μεταβολίζονται με σύζευξη με τη GSH; υψηλές δόσεις μπορούν να εξαντλήσουν την GSH και να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Εξάντληση των διατροφικών αντιοξειδωτικών και άλλων βασικών συστατικών της διατροφής μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες.
2. Αυξημένη παραγωγή ROS/RNS, π.χ. από έκθεση σε αυξημένα επίπεδα τοξινών που είτε είναι τα ίδια δραστικά είδη είτε μεταβολίζονται σε τέτοια είδη ή από ενεργοποίηση “φυσικών” συστημάτων παραγωγής ROS/RNS (π.χ. ενεργοποίηση φαγοκυττάρων σε χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες).





Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση οξειδωτικού στρες.

### 1.6.1. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

1. Βλάβη στους ιστούς. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). 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 στον εκφυλισμό του.
2. Κυτταρικός θάνατος. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενο των κυττάρων περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, όπως CAT ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται σε θάνατο

από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο “μηχανισμός αυτοκτονίας” του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες.

### **1.6.2. Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες**

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να εκτιμηθεί με μέτρηση i) των ελευθέρων ριζών, ii) των βλαβών σε λιπίδια, πρωτεΐνες ή DNA και iii) της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας.

#### **1.6.2.α. Άμεση ανίχνευση των ελευθέρων ριζών**

Η παραγωγή των ROS μπορεί να προσδιοριστεί με άμεσες μεθόδους. Η τεχνική του συντονισμού περιστροφής των ηλεκτρονίων είναι μια άμεση φασματοσκοπική μέθοδος που επιτρέπει την άμεση μέτρηση των ROS σύμφωνα με τις παραμαγνητικές τους ιδιότητες (Rimbach et al., 1999; Ashton et al., 1999; Ashton et al., 1998). Οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν *in vitro*, *in vivo* ή *ex vivo*.

#### **1.6.2.β. Προσδιορισμός της οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA**

Μια βασική προσέγγιση μελέτης του οξειδωτικού στρες είναι η μέτρηση του ρυθμού υπεροξειδωσις των μεμβρανικών λιπιδίων ή των λιπαρών οξέων. Η λιπιδική υπεροξειδωσις οδηγεί σε καταστροφή των λιπιδίων και σχηματισμό ενός ευρέους φάσματος πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης, όπως τα συζευγμένα διένια ή τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, όπως η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), τα F<sub>2</sub>-ισοπροστάνια, το πεντάνιο, το αιθάνιο ή το εξάνιο. Η μέτρηση των συζευγμένων διενίων ανιχνεύει τη μοριακή αναδιοργάνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της λιπιδικής υπεροξειδωσις. Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία είναι ένας ακόμη δείκτης της αρχικής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών. Η MDA είναι ένα δευτερογενές προϊόν οξείδωσης

και παράγεται κατά την αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων. Αυτή η ουσία προσδιορίζεται κατά την αντίδραση της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, που παράγει τις δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS). Ο προσδιορισμός των F<sub>2</sub>-ισοπροστανίων, ένα ακόμη δευτερογενές προϊόν οξειδωσης, είναι μια ακόμη μέθοδος προσδιορισμού της ενδογενούς λιπιδικής υπεροξειδωσης και οξειδωτικής βλάβης.

Η τροποποίηση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί το σχηματισμό καρβονυλομάδων στα αμινοξέα των πλευρικών αλυσίδων. Αύξηση των καρβονυλίων είναι παρούσα σε κάθε φαινόμενο που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (Stadman & Levine, 2000). Έτσι, η μέτρηση του σχηματισμού καρβονυλίων είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεϊνικής βλάβης (Levine, 2002; Stadman & Levine, 2000). Οι ολικές πρωτεΐνες συχνά μετριοούνται, με σκοπό ο λόγος των καρβονυλίων προς τις πρωτεΐνες να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρωτεϊνικής οξειδωσης. Ακόμη, ο προσδιορισμός των οξειδωμένων αμινοξέων αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο μέτρησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Leewenburgh et al., 1999).

Οι ROS επάγουν πολλούς τύπους DNA βλάβης όπως σπάσιμο κλώνων, τροποποιήσεις βάσεων και σταυροδιασυνδέσεις DNA-πρωτεΐνης. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των DNA τροποποιήσεων (Dizdaroglu et al., 2002). Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης είναι το νουκλεοτίδιο 8-OHdG, που παράγεται κατά την οξείδωση της γουανίνης από τις ελεύθερες ρίζες. Το οξειδωμένο DNA συνεχώς επιδιορθώνεται και τα οξειδωμένα νουκλεοτίδια όπως το 8-OHdG απεκκρίνονται μέσω του αίματος και των ούρων.

### **1.6.3. Αντιοξειδωτικές μετρήσεις**

#### **1.6.3.α. Ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα**

Η ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα (SOD, CAT, GP<sub>x</sub>) προσδιορίζεται σε μια μεγάλη πλειοψηφία μελετών. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εκτιμήσει την ποιότητα της αντιοξειδωτικής προστασίας υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά μπορεί επίσης να δείξει τη σημασία του οξειδωτικού στρες, ειδικά μετά από φυσική δραστηριότητα. Η αντιοξειδωτική ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να μεταβληθεί διαφορετικά: να αυξηθεί στην αρχή (προσαρμογή) ή να μειωθεί εάν το οξειδωτικό στρες είναι σημαντικό ή μεγάλο (χρήση).

### **1.6.3.β. Αντιοξειδωτικές βιταμίνες**

Η ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (βιταμίνη Α, C, E) είναι μια κοινή μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής προστασίας και της ανίχνευσης της ανεπάρκειας βιταμίνης (Rimbach et al., 1999; Prior & Cao, 1999). Όπως και με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών βιταμινών αλλάζουν παρουσία οξειδωτικού στρες και μπορεί να αποτελέσουν έμμεσους δείκτες οξειδωτικού στρες (Rimbach et al., 1999).

### **1.6.3.γ. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα**

Ο μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών στα ανθρώπινα υγρά ή τους ιστούς κάνει δύσκολη τη μέτρηση κάθε αντιοξειδωτικού ξεχωριστά. Επομένως, πολλοί μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ενός βιολογικού δείγματος (Ashton et al., 1998). Η χρήση ενός προοξειδωτικού με σκοπό να ποσοτικοποιήσουμε την ικανότητα απορρόφησης της ρίζας οξυγόνου είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές (Cao & Prior, 2000).

### **1.6.3.δ. Άλλα αντιοξειδωτικά**

Μια ακόμη τεχνική για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού και του οξειδωτικού στρες είναι η μέτρηση των θειολών. Όπως και με τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά, απώλεια θειολών μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια μεγάλης περιόδου οξειδωτικού στρες. Όμως η ποσοτικοποίηση της GSH, η πιο σημαντική θειόλη στο ανθρώπινο σώμα, και της GSSG (η οξειδωμένη μορφή της GSH) είναι μια γνωστή τεχνική για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες. Ο λόγος GSH/GSSG είναι ένας ενδιαφέρον δείκτης οξειδωτικού στρες επειδή οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν την GSH σε GSSG (Tessier et al., 1995; Svensson et al., 2002).

Το ουρικό οξύ είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό στο πλάσμα και τους μύες (Marklund et al., 2000). Η αλλαντοΐνη, ένα προϊόν οξείδωσης του ουρικού οξέος, μπορεί επίσης να είναι ένας αξιόλογος ενδογενής δείκτης οξειδωτικού στρες.

## **1.7. Οξειδωτικό στρες και άσκηση**

Η άσκηση έχει συνδεθεί με θετικά αποτελέσματα στο καρδιαγγειακό σύστημα, το μεταβολισμό, το μυϊκό σύστημα κ.α. Μερικά από αυτά τα οφέλη συνδέονται με μείωση της πίεσης του αίματος, αύξηση της ενεργειακής δαπάνης κατά

την ηρεμία, αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ, μείωση της λιπώδους μάζας και αύξηση της μάζας χωρίς λίπος. Η πλειοψηφία των μελετών που έχει εξετάσει τις θετικές επιδράσεις της άσκησης, έχει χρησιμοποιήσει είτε άσκηση αντοχής (αερόβια άσκηση) είτε άσκηση αντιστάσεως (αναερόβια άσκηση) (Booth et al., 2000).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η εξαντλητική άσκηση συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και άρα επάγει την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες.

### **1.7.1.α. Αερόβια άσκηση**

#### *Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών*

Ο Davies et al. (1982) ήταν ο πρώτος που έδειξε ότι η άσκηση αυξάνει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Από τότε, πολλές μελέτες αποκάλυψαν τις επιδράσεις της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Οι περισσότερες από αυτές περιελάμβαναν αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία και κολύμβηση) (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al., 1998; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένο  $\text{VO}_2$ , γεγονός το οποίο ίσως αυξάνει την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών.

Οι περισσότεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων για να οξειδώσουν ποικίλα μεταβολικά υποστρώματα, έτσι ώστε η αποθηκευμένη ενέργεια να απελευθερωθεί για διάφορες βιολογικές δραστηριότητες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα περισσότερα μόρια οξυγόνου ανάγονται σε νερό αλλά ένα ποσοστό περίπου 2-5% ανάγεται σε ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Κατά τη διάρκεια μέγιστης έντασης άσκησης ο  $\text{VO}_2$  στον οργανισμό αυξάνει έως και 20 φορές ενώ σε επίπεδο μυϊκών ινών αυξάνει έως και 100 φορές (Meydani & Evans, 1993). Έτσι, αν το ποσοστό  $\text{O}_2$  μετατρέπεται σε ROS παραμένει το ίδιο, κατά τη διάρκεια της έντονης άσκησης θα αυξηθεί αναλογικά. Επομένως, πολλές μελέτες έδειξαν ότι τέτοια φυσική δραστηριότητα προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών και στα ζώα και στους ανθρώπους. ( Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu MI et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Child et al., 1998; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005; Vider et al., 2001).

Όμως αυτό το φαινόμενο δεν μπορεί να συμβεί σε άσκηση χαμηλής έντασης (< 50% μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου [ $\text{VO}_{2\text{max}}$ ]). Σε μια τέτοια περίπτωση η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού επαρκεί και δεν εμφανίζεται κάποια βλάβη προκαλούμενη από τις ελεύθερες ρίζες (Lovlin et al., 1987). Όσο πιο έντονη είναι η άσκηση τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών και επομένως και το οξειδωτικό στρες. (Palmer et al., 2003; Lovlin et al., 1987).

### **1.7.1.β. Αναερόβια άσκηση**

#### *Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών*

Η αναερόβια άσκηση είναι ένας τύπος άσκησης που περιλαμβάνει μια ποικιλία δραστηριοτήτων [σπριντς, άλματα, άσκηση αντιστάσεων (έκκεντρη ή ομόκεντρη άσκηση)]. Η αύξηση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών που σχετίζεται με την αναερόβια άσκηση πραγματοποιείται από ποικίλα μονοπάτια εκτός της διαρροής ηλεκτρονίων όπως συμβαίνει κατά την αερόβια άσκηση. Η παραγωγή οξειδάσης της ξανθίνης, η ισχαιμική επαναιμάτωση και η φαγοκυτταρική αναπνευστική έκρηξη εμπλέκονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της αναερόβιας άσκησης. Επιπλέον, οι αυξήσεις του γαλακτικού οξέος, της κατεχολαμίνης και της φλεγμονής μετά την άσκηση αποτελούν άλλους παράγοντες που μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών.

Η ισχαιμική επαναιμάτωση του ενεργού μυός εμπλέκεται στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια και μετά την αναερόβια άσκηση. Αυτός ο τύπος άσκησης αυξάνει σημαντικά τον καταβολισμό των πουρινών και προκαλεί μια γρήγορη αποξυγόνωση (φαινόμενο της ισχαιμικής επαναιμάτωσης). Αυτά τα δύο φαινόμενα είναι γνωστό ότι αυξάνουν τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία επιταχύνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στους ισχαιμικούς ιστούς, η δεϋδρογονάση της ξανθίνης υφίσταται πρωτεολυτική μετατροπή στην οξειδωμένη της μορφή η οποία χρησιμοποιεί  $\text{O}_2$  σαν δέκτη ηλεκτρονίων. Είναι γνωστό ότι η οξειδάση της ξανθίνης παρουσία υποστρωμάτων υποξανθίνης ή ξανθίνης ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε  $\text{O}_2^{\cdot-}$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι το ένζυμο ανάγει περαιτέρω το  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $\text{OH}^{\cdot}$ . Οι ρίζες  $\text{OH}^{\cdot}$  και  $\text{O}_2^{\cdot-}$  αντιδρούν με κυτταρικές πρωτεΐνες και μεμβράνες προκαλώντας κυτταρική βλάβη.

Άλλη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της αναερόβιας άσκησης είναι η φλεγμονή και η κυτταρική βλάβη, που συμβαίνουν συχνά μετά από

άσκηση που προκαλεί τραυματισμό. Μια απελευθέρωση σιδήρου από την αιμοσφαιρίνη ή τη φερριτίνη ίσως πολλαπλασιάζει τη φλεγμονώδη απάντηση και το οξειδωτικό στρες. Ακόμη, υπάρχει μια θετική σύνδεση ανάμεσα στην αύξηση του γαλακτικού οξέος και στη αύξηση δεικτών του οξειδωτικού στρες. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση των συγκεντρώσεων της NADH και NADPH και συνεπώς σε μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης και αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών.

### **1.7.2. Πηγές παραγωγής ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης**

Υπάρχουν πολλές πιθανές πηγές παραγωγής ROS και RNS στους ιστούς κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά ελάχιστες μελέτες έχουν εξετάσει τους κυρίαρχους ιστούς που είναι υπεύθυνοι γι' αυτή την παραγωγή. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην περιορισμένη πρόσβαση στους περισσότερους ανθρώπινους ιστούς και στην περίπλοκη φύση της άσκησης που εμπλέκει πολλά συστήματα οργάνων. Ως εκ τούτου αν και πολλές μελέτες έχουν εξετάσει δείκτες δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών, η πλειοψηφία αυτών των μελετών έχουν υποθέσει ότι ο σκελετικός μυς αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών και ROS κατά την άσκηση.

#### **1.7.2.α. Ενδογενείς θέσεις παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ ) κατά την άσκηση**

Ο σκελετικός μυς παράγει  $O_2^{\cdot -}$  σε πολλαπλές υποκυτταρικές θέσεις, πολλές από τις οποίες αυξάνουν σε δραστηριότητα κατά τη διάρκεια των μυϊκών συστολών (Εικόνα 12).

#### *Μιτοχόνδρια*

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ως η κύρια πηγή ROS στα μυϊκά κύτταρα (Davies et al., 1982; Koren et al., 1982). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει τις κύριες θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot -}$  στα μιτοχόνδρια και τα περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι τα συμπλέγματα I και III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι οι κύριες θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot -}$  (Barja, 1999; Muller et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η αυξημένη παραγωγή ROS που συμβαίνει κατά τη συστολή συνδέεται άμεσα με την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, αυξάνοντας 50 έως 100 φορές την παραγωγή  $O_2^{\cdot -}$  στον σκελετικό μυ.

### *Σαρκοπλασματικό δίκτυο*

Μελέτες έχουν εντοπίσει ένζυμα της NAD(P)H οξειδάσης να σχετίζονται με το σαρκοπλασματικό δίκτυο του καρδιακού (Cherednichenko et al., 2004) και του σκελετικού μυός (Xia et al., 2003). Το  $O_2^{\cdot-}$  που παράγεται από αυτά τα ένζυμα επηρεάζει την απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο μέσω οξειδωσης του υποδοχέα ρυανοδίνης (Cherednichenko et al., 2004).

### *Εγκάρσιοι σωληνίσκοι*

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι οι εγκάρσιοι σωληνίσκοι του σκελετικού μυός περιέχουν μια NAD(P)H οξειδάση της οποίας η δραστηριότητα αυξάνεται με εκπόλωση (Hidalgo et al., 2006; Espinosa et al., 2006). Αυτό το ένζυμο περιέχει μερικές από τις κλασικές υπομονάδες που εντοπίζονται στην NAD(P)H των φαγοκυττάρων και φαίνεται ότι απελευθερώνει  $O_2^{\cdot-}$  στο κυτοσόλιο των σκελετικών μυϊκών κυττάρων.

### *Μεμβράνη πλάσματος*

Πολυάριθμες μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα απελευθερώνουν  $O_2^{\cdot-}$  στον εξωκυττάριο χώρο (McArdle et al., 2001; Patwell et al., 2004; Reid et al., 1992; Zuo et al., 2000). Όλα τα κύτταρα περιέχουν συστήματα οξειδοαναγωγής ικανά να αναλάβουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της μεμβράνης του πλάσματος. Ένα σύμπλεγμα NAD(P)H οξειδάσης έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται στο διάφραγμα και του μύες αρουραίων και εντοπίζεται στη μεμβράνη του πλάσματος (Javesghani et al., 2002). Αυτό το ένζυμο περιέχει τέσσερις από τις υπομονάδες που βρίσκονται στο ένζυμο των φαγοκυττάρων ( $gp91^{phox}$ ,  $p22^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ) και σχετίζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες.

### *Φωσφολιπάση $A_2$*

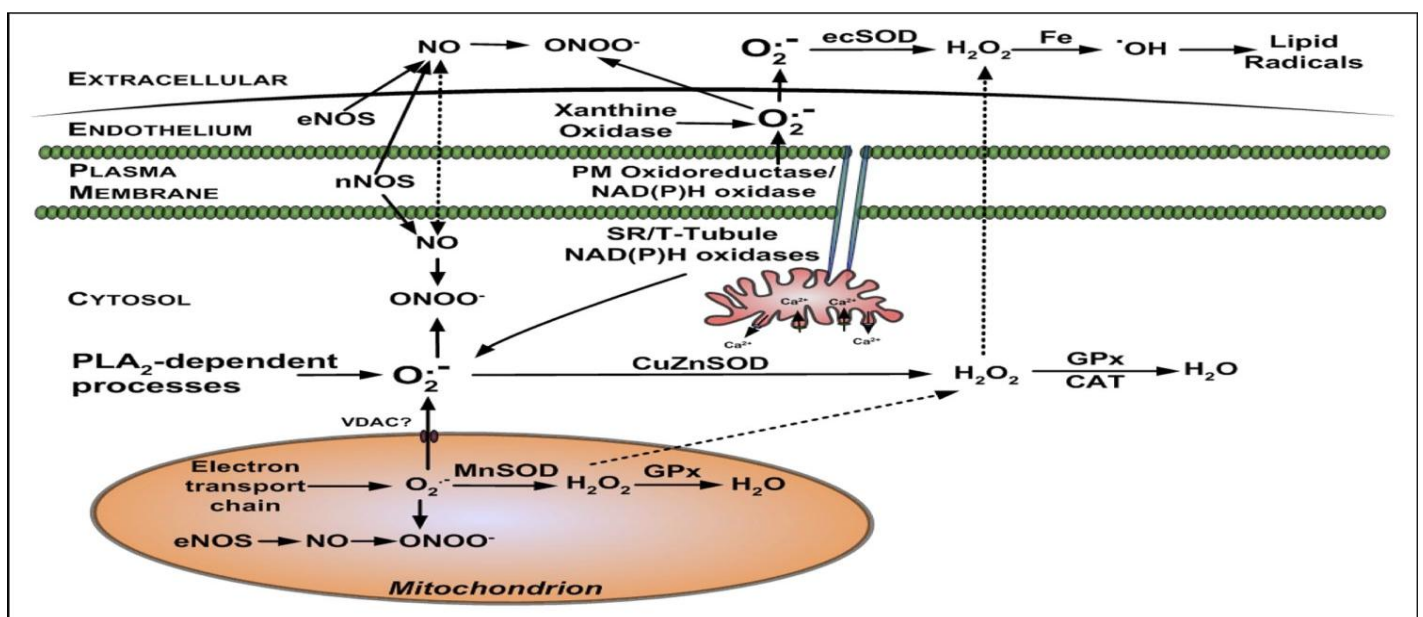
Η φωσφολιπάση  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια απελευθερώνοντας αραχιδονικό οξύ, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για ενζυμικά συστήματα παραγωγής ROS, όπως οι λιποξυγενάσες (Zuo et al., 2004). Επίσης, η ενεργοποίηση της PLA<sub>2</sub> μπορεί να διεγείρει NAD(P)H οξειδάσες (Zhao et al., 2002). Αυξημένη δραστηριότητα της PLA<sub>2</sub> διεγείρει την παραγωγή ROS στα μυϊκά μιτοχόνδρια (Nethery et al., 2000) και στο κυτοσόλιο (Gong et al., 2006), απελευθερώνοντας τις ROS στον εξωκυττάριο χώρο (Zuo et al., 2004). Τόσο η



ασβεστο-εξαρτώμενη (sPLA<sub>2</sub>) όσο και η μη εξαρτώμενη μορφή (iPLA<sub>2</sub>) παίζουν ρόλο στην παραγωγή ROS στους μύες. Η iPLA<sub>2</sub> ρυθμίζει την κυτοσολική οξειδωτική δραστηριότητα στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (Gong et al., 2006) ενώ η sPLA<sub>2</sub>, που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, διεγείρει την παραγωγή ROS κατά τη διάρκεια της συστολής. Επίσης, σε μη μυϊκά κύτταρα η δραστηριότητα της τρίτης κύριας μορφής PLA<sub>2</sub>, η κυτοσολική (cPLA<sub>2</sub>), που ενεργοποιείται από μικρομοριακές συγκεντρώσεις ασβεστίου, έχει συνδεθεί με παραγωγή ROS (Muralikrishna et al., 2006). Ο Gong et al. (2006) υπέθεσαν ότι η iPLA<sub>2</sub> ήταν ο κύριος ρυθμιστής της δραστηριότητας των ROS σε συνθήκες ηρεμίας, ενώ κατά τη διάρκεια συστολών, θερμικού στρες ή άλλων διαδικασιών που αυξάνουν το ενδοκυτταρικό ασβέστιο, η sPLA<sub>2</sub> ενεργοποιήθηκε και διέγειρε την παραγωγή ROS.

### 1.7.2.β. Ενδογενείς θέσεις παραγωγής NO

Το NO παράγεται συνεχώς στον σκελετικό μυ, μια παραγωγή που αυξάνεται με τις συστολές (Balon & Nadler, 1994; Kobzik et al., 1994). Ο σκελετικός μυς φυσιολογικά εκφράζει τη νευρωνική (nNOS) και την ενδοθηλιακή (eNOS) isoμορφή NOS. Η nNOS εντοπίζεται στο μυϊκό σαρκόλημμα όπου σχετίζεται με το σύμπλεγμα δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης. Η eNOS βρίσκεται στα μιτοχόνδρια του μυός (Kobzik et al., 1995). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα απελευθερώνουν αυξημένα ποσά NO κατά τη συστολή (Patwell et al., 2004). Η nNOS φαίνεται να είναι η κύρια πηγή NO που απελευθερώνεται από τον σκελετικό μυ (Hirschfield et al., 2000).



Εικόνα 13: Πιθανές θέσεις παραγωγής σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) και μονοξειδίου του αζώτου (NO) στον σκελετικό μυ.

## 2. Φλεγμονή

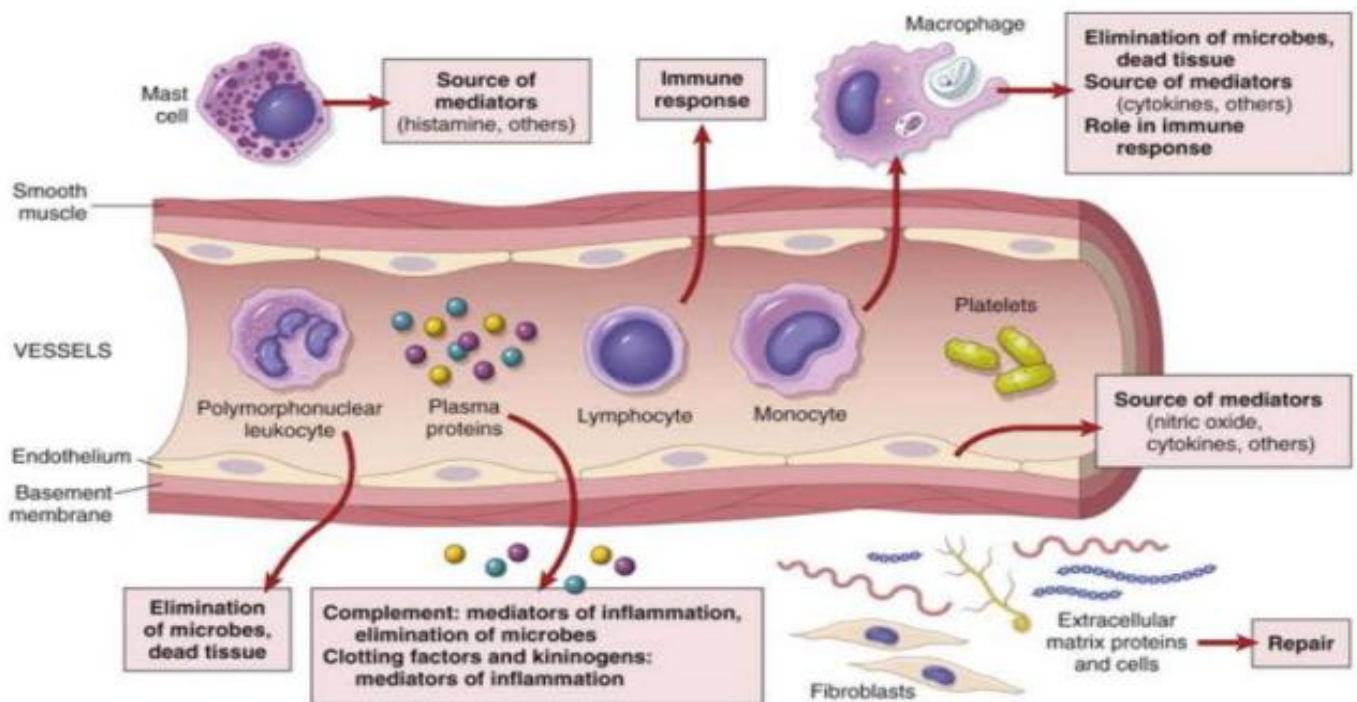
Η φλεγμονή είναι μια τοπική προστατευτική αντίδραση των κυττάρων και των ιστών του σώματος σε αλλεργικά ή χημικά ερεθίσματα, τραυματισμούς και/ή μολύνσεις. Τα συμπτώματα της φλεγμονής χαρακτηρίζονται από πόνο, ερυθρότητα, οίδημα και απώλεια λειτουργίας που προκύπτουν από διαστολή των αιμοφόρων αγγείων που οδηγούν σε αυξημένη παροχή αίματος και από αυξημένα μεσοκυττάρια διαστήματα με αποτέλεσμα τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων, πρωτεϊνών και υγρών στην περιοχή της φλεγμονής (Parham, 2000). Ασθένειες και διαταραχές εκδηλώνονται μέσω φλεγμονωδών αντιδράσεων καθώς το σώμα αναγνωρίζει τον τραυματισμό και προετοιμάζεται για την επιδιόρθωση της βλάβης. Για να εκτιμηθεί η διαδικασία της φλεγμονής, είναι σημαντικό να κατανοηθεί ο ρόλος των χημικών μεσολαβητών. Αυτοί οι μεσολαβητές είναι οι ουσίες που απελευθερώνονται ως πρωτεΐνες του πλάσματος ή αυτές που προέρχονται από κύτταρα όπως τα μαστοκύτταρα, αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα/μακροφάγα. Ενεργοποιούνται από αλλεργικούς ή χημικούς ερεθισμούς, τραυματισμούς και μολύνσεις. Αυτοί οι μεσολαβητές ανάλογα με τη διάρκεια του τραυματισμού, καθορίζουν τη σοβαρότητα της φλεγμονής και χαρακτηρίζονται με τον όρο προφλεγμονώδεις παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στα κύτταρα και μπορεί να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα, προωθούν την χημειοταξία των ουδετερόφιλων, διεγείρουν την ομαλή σύσπαση των μυών, αυξάνουν την άμεση ενζυμική δραστηριότητα, προκαλούν πόνο και/ή μεσολαβούν σε οξειδωτική βλάβη (Coleman, 2002). Παραδείγματα χημικών μεσολαβητών αποτελούν το μονοξειδίο του αζώτου (NO), οι προσταγλανδίνες (PG), τα λευκοτριένια (LK), οι αγγειοδραστικές αμίνες (ισταμίνη, σεροτονίνη) και οι κυτοκίνες [παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), ιντερλευκίνες (IL) 1-12]. Ορισμένες από αυτές τις κυτοκίνες (IL-3-4-5-6-10-13) που απελευθερώνονται είναι ωφέλιμες καθώς δρουν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες μέσα στα κύτταρα (Esch & Stefano, 2002).

Αν και η διαδικασία της φλεγμονής είναι περίπλοκη, χωρίζεται σε δύο κυρίως μέρη, την οξεία και την χρόνια που μπορεί να είναι είτε ωφέλιμη είτε επιζήμια.

- Η οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζεται από ταχεία έναρξη και είναι μικρής διάρκειας. Χαρακτηρίζεται επίσης από απελευθέρωση υγρών και πρωτεϊνών του πλάσματος καθώς και από μετακίνηση των

λευκοκυττάρων και ιδιαίτερα των ουδετερόφιλων στην τραυματισμένη περιοχή. Αυτή η οξεία φλεγμονώδης απόκριση είναι ένας μηχανισμός άμυνας με σκοπό τη θανάτωση των βακτηρίων, των ιών, των παρασίτων ενώ επίσης διευκολύνει την επιδιόρθωση του τραύματος.

- Η χρόνια φλεγμονή έχει πιο παρατεταμένη διάρκεια και εκδηλώνεται ιστολογικά από την παρουσία λεμφοκυττάρων και μακροφάγων με αποτέλεσμα την ίνωση και νέκρωση των ιστών. Η χρόνια, χαμηλού επιπέδου φλεγμονή χαρακτηρίζεται από δύο έως τέσσερις φορές αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) καθώς και από μικρές αυξήσεις στον αριθμό των ουδετερόφιλων και των φυσικών φονικών κυττάρων. Η χρόνια φλεγμονή εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών χρόνιων ασθενειών όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, διαβήτης τύπου 2, καρκίνος, χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος και νόσος Alzheimer.



**Εικόνα 14:** Τα συστατικά της οξείας και χρόνιας φλεγμονής και οι βασικές τους λειτουργίες.

**Λευκοκύτταρα.** Μια ποικιλία παραγόντων συνεργάζονται για τη μεταφορά των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία στην περιοχή της φλεγμονής. Εκτός από τις μεταβολές στη ροή του αίματος και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, τα

ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς προσκόλλησης που δεσμεύουν τα λευκοκύτταρα που φέρουν τα αντίστοιχα μόρια προσκόλλησης. Οι αλληλεπιδράσεις της κυτταρικής επιφάνειας των μορίων προσκόλλησης λειτουργούν σαν κλειδί-κλειδαριά στην διαμεσολάβηση της προσκόλλησης και μετατρέπουν τα κανονικά τοιχώματα των αγγείων σε κολλώδη επιφάνεια για την αγκυροβόληση των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων. Με βάση τις δομικές ομοιότητες, τέσσερις υπεροικογένειες μορίων προσκόλλησης εμπλέκονται στην στρατολόγηση των κυκλοφορούντων κυττάρων του αίματος: 1) οι ιντεγκρίνες, 2) τα μεσοκυττάρια μόρια προσκόλλησης (ICAM) 1 και 2 και τα αγγειακά μόρια προσκόλλησης (VCAM), 3) οι σελεκτίνες (L- P- και E σελεκτίνη) και 4) προσδέτες σελεκτινών. Μόλις τα λευκοκύτταρα δεσμευτούν, χημειοτακτικά σήματα προσδένονται σε υποδοχείς των λευκοκυττάρων και τους σηματοδοτούν για να κινηθούν προς την υψηλότερη συγκέντρωση χημειοελκυστικών. Αυτή η διαδικασία της μετανάστευσης των ουδετερόφιλων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων από τον αυλό του αγγείου στους ιστούς, αποτελείται από τις ακόλουθες διαδοχικές φάσεις: προσκόλληση λευκοκυττάρων, μετακίνηση, σταθερή σύνδεση και τέλος μετανάστευση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων.

**Μονοκύτταρα/Μακροφάγα.** Τα μονοκύτταρα φτάνουν στο σημείο της μόλυνσης πολύ αργότερα από τα ουδετερόφιλα, λόγω της καθυστερημένης έκφρασης του υποδοχέα VCAM συμπληρωματικού των μορίων ICAM στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Τα μονοκύτταρα προσελκύονται στην περιοχή της μόλυνσης από χημειοελκτικά μόρια όπως βακτηριακά πεπτιδικά θραύσματα. Κατά την άφιξη τους στον ιστό τα μονοκύτταρα ωριμάζουν σε μακροφάγα και αρχίζουν γρήγορα την εκκαθάριση των κατεστραμμένων ιστών και των μικροοργανισμών στις γύρω περιοχές. Τα μακροφάγα εμπλέκονται όχι μόνο στη μικροβιοκτόνο δράση αλλά επίσης και στη ρύθμιση της φλεγμονώδους/ ανοσολογικής απόκρισης μέσω της παρουσίασης αντιγόνου, της παραγωγής κυτοκινών, της εκκαθάρισης μέσω της φαγοκυτταρικής και ενζυμικής δραστηριότητας και τον συντονισμό της επιδιόρθωσης των ιστών. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση δραστικών ενδιάμεσων του οξυγόνου και του NO, τα οποία είναι ισχυροί μικροβιοκτόνοι παράγοντες και παράγονται στα λυσοσώματα των μακροφάγων (Janeway, 2005). Δραστικά ενδιάμεσα του οξυγόνου και του NO μπορούν επίσης να απελευθερωθούν σε γειτονικούς ιστούς όπου σκοτώνουν εξωκυττάρια μικρόβια και μπορούν επίσης να καταστρέψουν κανονικό

ιστό. Τα μακροφάγα εκκρίνουν κυρίως τρεις κυτοκίνες την IL-1, την IL-6 και τον TNF-a καθώς και προσταγλανδίνες, λευκοτριένια που επάγουν φλεγμονή (Gameel & Tartour, 1974). Οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται από την περιοχή της φλεγμονής διευκολύνουν τόσο την προσκόλληση των κυττάρων του ανοσοποιητικού σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και την μετανάστευσή τους μέσω του αγγειακού τοιχώματος στους ιστούς.

**Κυτοκίνες.** Οι κυτοκίνες είναι πολυπεπίδια που παράγονται σε απόκριση σε μικρόβια και άλλα αντιγόνα και διαμεσολαβούν και ρυθμίζουν ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Dinarello, 1997). Από την περιοχή της μόλυνσης, τα κύτταρα του τοπικού ιστού εκκρίνουν κάποιες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF $\alpha$ , IL-1, χημειοκίνες) οι οποίες μεσολαβούν σε πολλές από τις τελεστικές λειτουργίες της έμφυτης ανοσίας καθώς και τους μεσολαβητές της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης. Ο TNF $\alpha$  εκκρίνεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, από φυσικά φονικά κύτταρα και από τοπικά μαστοκύτταρα ενώ η IL-1 εκκρίνεται επίσης από ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα (Wolf et al., 1996). Οι λιπολυσασκαχαρίτες διεγείρουν την παραγωγή του TNF $\alpha$  και της IL-1. Και οι δύο προφλεγμονώδεις κυτοκίνες επάγουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1) για τα λευκοκύτταρα. Διεγείρουν επίσης τα μακροφάγα να εκκρίνουν χημειοκίνες, που αυξάνουν τη συγγένεια των ιντεγκρινών των λευκοκυττάρων με τους προσδέτες τους (Moldawer, 1997). Ο TNF $\alpha$  και η IL-1 όταν εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες, ασκούν ενδοκρινείς επιδράσεις προκαλώντας πυρετό και καχεξία. Οι χημειοκίνες δρουν σαν χημειοελκτικά μόρια για τα λευκοκύτταρα και παράγονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λευκοκύτταρα και άλλες κυτοκίνες (Rollins, 1997). Η IL-6 λειτουργεί τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία. Συντίθεται σε απόκριση σε μικρόβια και άλλες κυτοκίνες όπως η IL-1 και ο TNF $\alpha$ .

**Αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές.** Η καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, καθώς επίσης η έναρξη και η διατήρηση της υποστηρίζεται από ένα δίκτυο κυτοκινών. Μία από αυτές τις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες είναι η IL-4 ικανή να αναστέλλει την παραγωγή της IL-8 από τα ουδετερόφιλα, να μειώνει την προπηκτική δραστηριότητα των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων και να εμποδίζει την ενεργοποίηση των μακροφάγων καθώς προωθεί την απόπτωση τους. Η IL-4 επίσης επάγει τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων σε T βοηθητικά κύτταρα τύπου 2

(TH2), τα οποία εκκρίνουν επιπλέον ανασταλτικές κυτοκίνες, κυρίως την IL-10 και την IL-13.

## **2.1. Φλεγμονή και άσκηση**

Η έντονη άσκηση προκαλεί μυϊκή βλάβη και επακόλουθη φλεγμονή, η οποία υποδεικνύεται από μυϊκό πόνο και οίδημα, παρατεταμένη απώλεια μυϊκής λειτουργίας και εκκροή μυϊκών πρωτεϊνών όπως η κινάση της κρεατίνης (CK) και της μυοσφαιρίνης (Mb) στην κυκλοφορία (Nosaka et al., 2003; Savers & Clarkson, 2003; Suzuki et al., 1999; Suzuki et al., 2000). Είναι γνωστό ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί μεγαλύτερη μυϊκή βλάβη και φλεγμονή από την ομόκεντρη ή ισομετρική άσκηση (Nosaka et al., 2003).

Η επαγόμενη από άσκηση μυϊκή βλάβη είναι ένα καλά τεκμηριωμένο φαινόμενο (Cannon & Pierre, 1998; Clarkson & Sayers, 1999) που προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση (Tidball, 1995). Η μυϊκή βλάβη ορίζεται ως ‘η απώλεια της μυϊκής λειτουργίας που προκαλείται από φυσική διαταραχή των μυϊκών δομών που εμπλέκονται στην παραγωγή ή τη διαβίβαση δύναμης’ (Koh, 2002). Μεταξύ των μυϊκών συστολών, η υψηλής ισχύος έκκεντρη άσκηση προκαλεί βλάβη στους σκελετικούς μύες που δεν είναι συνηθισμένοι σε τέτοια άσκηση. Μέσα σε λίγα λεπτά από την έναρξη της έκκεντρης άσκησης παρατηρούνται διαταραχή των σαρκομερών, των κυτταροσκελετικών δομών που εμπλέκονται στη μετάδοση δύναμης, της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και διαταραχή της σύζευξης διέγερσης-συστολής και της παραγωγής δύναμης. Η αρχική διαταραχή των μυϊκών κυττάρων ακολουθείται από αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων και μυϊκών πρωτεϊνών καθώς και πρωτεϊνική αποικοδόμηση.

Η φλεγμονώδης απόκριση στην επαγόμενη από άσκηση μυϊκή βλάβη χαρακτηρίζεται από διείσδυση λευκοκυττάρων και παραγωγή προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών στον κατεστραμμένο μυϊκό ιστό, συστηματική απελευθέρωση των λευκοκυττάρων και των κυτοκινών. Τα ουδετερόφιλα εισβάλλουν στον σκελετικό μυ μέσα σε λίγες ώρες (Beaton et al., 2002) και παραμένουν έως και 24 ώρες μετά την άσκηση (Beaton et al., 2002; MacIntyre et al., 2000; Malm et al., 2000; Raastad et al., 2003; Stupka et al., 2001). Τα μακροφάγα είναι παρόντα στο μυ από 24 ώρες έως και 14 ημέρες μετά την άσκηση (Beaton et al., 2000; Hamada et al., 2005; Malm et al.,

2000; Peterson et al., 2003). Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα συμβάλλουν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Cannon et al., 1998). Οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNFα) εκφράζονται στον σκελετικό μυ έως και 5 ημέρες μετά την άσκηση (Hamada et al., 2005). Άλλες κυτοκίνες όπως η IL-6, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF)-β1 και ο παράγοντας υποξίας (HIF)-1β εκφράζονται επίσης στον σκελετικό μυ μετά την άσκηση (Hamada et al., 2005; Malm et al., 2004). Αυτή η τοπική φλεγμονώδης απόκριση συνοδεύεται από μια συστηματική απόκριση γνωστή και ως απόκριση οξείας φάσης. Αυτή η απόκριση περιλαμβάνει την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού ήπατο-παραγόμενων πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Η απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών εξισορροπείται από απελευθέρωση στη συστηματική κυκλοφορία αντιφλεγμονωδών πρωτεϊνών, όπως ο αναστολέας της IL-1 (IL-1ra), η IL-10 και ο υποδοχέας TNF (TNF-R) (Peake et al., 2005a; Petersen et al., 2001; Smith et al., 2000; Toft et al., 2002). Οι αναστολείς των κυτοκινών και οι αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες περιορίζουν το μέγεθος και τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης στην άσκηση.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε ότι η άσκηση επάγει μια απόκριση κυτοκινών πραγματοποιήθηκε το 1983 από τους Cannon & Kluger. Το 1986, δύο μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της IL-1 αυξήθηκαν σε απόκριση στην άσκηση (Cannon et al., 1986; Evans et al., 1986). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της IL-1a, της IL-10, της IL-8, της IL-6 και του TNF-α αυξάνουν σε απόκριση στην άσκηση (Febbraio and Pedersen, 2002, 2005; Gleeson and Bishop, 2005; Pedersen et al., 2004; Petersen and Pedersen, 2005). Μετά από ένα αγώνα μαραθωνίου, τα επίπεδα πλάσματος της IL-1β, της IL-8 και του TNF-α αυξάνουν 2-3 φορές ενώ τα επίπεδα της IL-6 αυξάνουν έως και 100 φορές (Nieman et al., 2001; Pedersen et al., 2001; Suzuki et al., 2003). Τα επίπεδα της IL-1ra αυξάνουν σε παρόμοιο μέγεθος αλλά παραμένουν αυξημένα για πολλές ώρες μετά την άσκηση (Suzuki et al., 2000; Tracey et al., 2003). Η συγκέντρωση της IL-10 αυξάνει 30-60 φορές μετά την άσκηση (Nieman et al., 2000, 2002; Suzuki et al., 2003). Το μέγεθος των αλλαγών στις συγκεντρώσεις των κυτοκινών του πλάσματος εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης καθώς και από τον τύπο της μυϊκής συστολής.

## 2.2. Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην επαγόμενη από άσκηση φλεγμονώδη απόκριση

Η βλάβη των σκελετικών μυϊκών ινών μετά από άσκηση οδηγεί στην απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TNF- $\alpha$ , η IL-1 και η IL-6 από κύτταρα του ανοσοποιητικού και /ή κατεστραμμένα μυϊκά κύτταρα. Τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, ενεργοποιώντας την οξειδάση του NADPH για την απελευθέρωση ROS μέσω της αναπνευστικής έκρηξης. Στα αρχικά στάδια της οξείας φάσης της φλεγμονώδους απόκρισης, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες διεγείρουν τη γονιδιακή έκφραση μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, CINC-1, MCP-1) και την έκφραση της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου. Επιπλέον, οι κυτοκίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν ένζυμα που προωθούν την παραγωγή ROS (COX-2, οξειδάση του NADPH, XO) με πρόσδεση τους σε υποδοχείς μεμβρανών. Η αυξημένη ροή αίματος που ακολουθεί τον NO και τα μόρια προσκόλλησης, διευκολύνουν τα ουδετερόφιλα και τις κυκλοφορούντες κυτοκίνες να φτάσουν στον τραυματισμένο ιστό. Η παραπάνω διαδικασία ευνοεί την παραγωγή οξειδωτικών και την έκφραση αντιοξειδωτικών, μια κατάσταση που θεωρείται απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί η φλεγμονή υπό έλεγχο.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η επαγόμενη από άσκηση φλεγμονή σχετίζεται με διείσδυση φαγοκυττάρων και μπορεί να ρυθμίζεται μέσω οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του NF $\kappa$ B, του AP-1 και του MAPK. Η έντονη άσκηση επάγει σημαντική αύξηση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στην κυκλοφορία και τον μυϊκό ιστό. Η σύνθεση αυτών των κυτοκινών ρυθμίζεται από δύο MAPK μονοπάτια (p38 και ERK). Το ERK μονοπάτι έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην επαγόμενη από την IL-1 γονιδιακή έκφραση ενζύμων και πρωτεϊνικών μορίων που ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Jiang et al., 2004). Επιπλέον, υποστήριξη ότι η επαγόμενη από άσκηση φλεγμονή μπορεί να προκληθεί από διείσδυση λευκοκυττάρων και να ρυθμιστεί με έναν οξειδοαναγωγικό τρόπο προέρχεται από μια πρόσφατη μελέτη (Aoi et al., 2004) που έδειξε ότι α) το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την πυρηνική μετατόπιση του p65 και την έκφραση των CINC-1 και MCP-1 ενώ η  $\alpha$ -τοκοφερόλη μετριάζει αυτή την απόκριση στους L6 μυοσωλήνες και β) οι συγκεντρώσεις των CINC-1 και MCP-1 καθώς και τα επίπεδα του p65 αυξήθηκαν μετά από άσκηση και αυτές οι αποκρίσεις εξασθένησαν ξανά από τη βιταμίνη E.



Το σουπεροξειδίο καθώς και άλλες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν άμεσα και να τροποποιήσουν τη λειτουργία συστατικών πρωτεϊνών και να μειώσουν την ειδική από τον μυ παραγωγή δύναμης κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που ακολουθεί την άσκηση (Li & Reid, 2000; Supinski et al., 2000; Supinski et al., 1999). Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να μειώσουν την παραγωγή δύναμης, μειώνοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία που τελικά τροποποιεί τη ροή του ATP κατά τη διάρκεια και μετά από εντατική άσκηση (Callahan et al., 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να μειώσουν τη λειτουργία του σαρκοπλασματικού δικτύου κατά τη διάρκεια της φλεγμονής αλλάζοντας έτσι την απελευθέρωση ασβεστίου (Supinski & Callahan, 2006; Fischer et al., 2001; Mikawa et al., 2001).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ενεργοποιήσουν διάφορα πρωτεολυτικά μονοπάτια μέσω ενός TNF- $\alpha$ - μεσολαβούμενου μηχανισμού (Li et al., 2003; Li et al., 2000). Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται να αλλάζουν την έκφραση μορίων (MuRF1, E3 λιγάσες) που μεσολαβούν στην ουβικιτινίωση πρωτεϊνών που έχουν προγραμματιστεί για αποικοδόμηση κατά τη φλεγμονή (Li et al., 2003). Υπάρχουν αποδείξεις ότι μονοπάτια που περιλαμβάνουν ενεργοποίηση καλπαΐνης και κασπάσης, ίσως να διεγείρονται από ελεύθερες ρίζες στον σκελετικό μυ (Araujo & Carvalho, 2005; Volbracht et al., 2005). Επίσης, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της δραστηριότητας της καλπαΐνης σε άλλους ιστούς (Araujo & Carvalho, 2005; Volbracht et al., 2005).

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν εμπλακεί επίσης στη μείωση της σύνθεσης των σκελετικών μυϊκών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών καταστάσεων. Η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης οφείλεται κυρίως στην αναστολή βασικών βημάτων που ρυθμίζουν τη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη. Η φλεγμονή μειώνει την ενεργοποίηση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 4E (σημαντικός παράγοντας για την πρωτεϊνική μετάφραση) με φωσφορυλίωση που μεσολαβείται από την MNK1, η οποία με τη σειρά της ελέγχεται από τον p38 (Vary et al., 2004). Οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται να ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του p38 από κυτοκίνες στους μύες και έτσι εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνθεση κατά τη διάρκεια καταβολικών καταστάσεων όπως η φλεγμονή (Li et al., 2005).

Φαίνεται ότι μια παροδική αύξηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι σημαντική για την αντισηπτική ασφάλεια του τραυματισμένου μυός και την διέγερση οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων σηματοδοτικών μονοπατιών. Όμως, μια σημαντική και παρατεταμένη αύξηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να διαταράξει την κυτταρική

αντιοξειδωτική κατάσταση και συνεπώς τη λειτουργία του μυός. Πολλά αντιοξειδωτικά αυξάνουν κατά την επαγόμενη από άσκηση φλεγμονή με σκοπό να αντισταθμίσουν την αύξηση του οξειδωτικού στρες.

### **3. Υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και άσκηση**

Η διατροφή έχει καθιερωθεί ως ένας από τους βασικούς παράγοντες που βοηθούν στην αποκατάσταση μετά από βαριά προπόνηση ή αγώνα (Ivy, 2004). Πολλοί αθλητές θεωρούν ότι τα συμπληρώματα διατροφής είναι πολύ σημαντικά για τη διατήρηση της απόδοσης τους κατά την άσκηση και για τη μακροζωία (Rodriguez et al., 2009) και εκτιμάται ότι 89% των κολλεγιακών αθλητών είτε έχουν χρησιμοποιήσει είτε χρησιμοποιούν συμπληρώματα διατροφής για να βελτιώσουν την απόδοσή τους (Froiland et al., 2004). Η κύρια πηγή καυσίμων κατά τη διάρκεια της έντονης άσκησης είναι το μυϊκό γλυκογόνο. Κατά την έντονη, παρατεταμένη άσκηση τα αποθέματα γλυκογόνου εξαντλούνται με αποτέλεσμα να μειώνεται και η απόδοση των αθλητών (Westerblad et al., 2010). Η ενδομυϊκή τριακυλογλυκερόλη καταναλώνεται και η αποκατάστασή της, παίζει σημαντικό ρόλο στον εφοδιασμό καυσίμων για επόμενη άσκηση αντοχής (van Loon et al., 2003). Η αποκατάσταση των αποθηκών γλυκογόνου γίνεται με την χορήγηση υδατανθράκων. Επιπρόσθετα, η παρατεταμένη-επίπονη άσκηση οδηγεί σε τραυματισμό των συστελλόμενων σκελετικών μυών, σε βλάβη των κυτταρικών συστατικών προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες και κινητοποίηση και καταβολισμό πρωτεϊνών (Belcastro et al., 1998; Tidball, 1995). Για να αντισταθμίσουν αυτά τα αποτελέσματα, οι αθλητές έχουν μεγαλύτερες θερμιδικές απαιτήσεις και 1.5 έως και 2.2 φορές αυξημένες ανάγκες σε πρωτεΐνη σε σχέση με άτομα που κάνουν καθιστική ζωή (Tipton & Wolfe, 2004).

Οι άμεσες ώρες μετά την άσκηση φαίνεται να είναι η καλύτερη στιγμή για τη χορήγηση θρεπτικών συστατικών με σκοπό τη διευκόλυνση της μυοκυτταρικής αποκατάστασης. Η αποκατάσταση του γλυκογόνου είναι πιο γρήγορη αμέσως μετά την άσκηση και επανέρχεται στα επίπεδα ηρεμίας μετά από 5 ώρες (Ivy, 2004). Όταν η πρόσληψη υδατανθράκων δεν είναι η βέλτιστη, τότε η συν-χορήγηση πρωτεΐνης διευκολύνει την αποκατάσταση του γλυκογόνου (Burke et al., 2004; Ivy et al., 2002). Ομοίως, η μυϊκή πρόσληψη αμινοξέων είναι μεγαλύτερη αμέσως μετά την άσκηση, μετά από ένα γεύμα που αυξάνει τις συγκεντρώσεις των αμινοξέων στο αίμα (Levenhagen et al., 2001,2002). Οι αυξημένες ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των

αμινοξέων και ιδιαίτερα της λευκίνης, διεγείρουν την πρωτεϊνική σύνθεση (Kimball & Jefferson, 2004). Για κάποιες ώρες μετά την άσκηση υπάρχει αυξημένη ροή αίματος στον ασκούμενο μυ, καθώς επίσης και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη (Goodyear et al., 1990; Ivy & Kuo, 1998), πρόσληψη αμινοξέων (Miller et al., 2003) και πρωτεϊνική σύνθεση, που κάνουν τον ιστό πιο δεκτικό σε θρεπτικά συμπληρώματα αυτή τη χρονική στιγμή.

Ακόμη κατά τη διάρκεια της έντονης άσκησης συμβαίνουν ανεπιθύμητες μεταβολικές αλλαγές που μπορεί να είναι επιβλαβείς για την φυσιολογική ομοιόσταση και συμπεριλαμβάνουν αυξημένη παραγωγή κυτοκινών, φλεγμονή και οξειδωτική βλάβη (Powers & Jackson, 2008). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος και η πρωτεΐνη σόγιας είναι υψηλής ποιότητας πηγές πρωτεϊνών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επομένως, μπορούν να εξαλείψουν την σχετιζόμενη από φλεγμονή οξειδωτική βλάβη και να βελτιώσουν τη σύνθεση του σώματος. Ακόμη, η χορήγηση υδατανθράκων μετριάξει την παραγωγή κυτοκινών που λαμβάνει χώρα κατά την φλεγμονή, διατηρώντας τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος σε υψηλά επίπεδα και χαμηλά τα επίπεδα των ορμονών που σχετίζονται με τον άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης του φλοιού των επινεφριδίων (HPA) (Davis et al., 1989; Mitchell et al., 1990; Murray et al., 1991; Smith et al., 1996).

### **3.1. Υδατάνθρακες**

Οι υδατάνθρακες μπορούν να χαρακτηριστούν από τη δομή τους και τον αριθμό των μορίων σακχάρων σαν μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες, που περιέχουν ένα μόριο σακχάρου, όπως η γλυκόζη και φρουκτόζη είναι απλά σάκχαρα. Οι δισακχαρίτες, όπως η σουκρόζη, περιέχουν δύο μόρια σακχάρων, και επίσης χαρακτηρίζονται ως απλοί υδατάνθρακες. Οι πολυσακχαρίτες, με πολλές μονάδες γλυκόζης ενωμένες μεταξύ τους, θεωρούνται σύνθετοι υδατάνθρακες. Οι σύνθετοι υδατάνθρακες είναι το καύσιμο επιλογής για την αναπλήρωση του γλυκογόνου.

Οι υδατάνθρακες παρέχουν τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάρκεια άσκησης αντοχής. Οι ενεργειακές απαιτήσεις της ανταγωνιστικής προπόνησης αντοχής υπερβαίνουν το ρυθμό με τον οποίο μπορεί να οξειδωθεί το λίπος, και έτσι οι υδατάνθρακες είναι η κύρια πηγή καυσίμων για αυτές τις αθλητικές δραστηριότητες. Οι υδατάνθρακες είναι επίσης η κύρια πηγή ενέργειας για επαναλαμβανόμενες υψηλής έντασης δραστηριότητες που

χρησιμοποιούν το αναερόβιο γλυκολυτικό σύστημα. Το πρωτογενές καύσιμο τα πρώτα 90-120 λεπτά της άσκησης είναι ο αποθηκευμένος υδατάνθρακας στην μορφή του μυϊκού γλυκογόνου. Είναι καλά τεκμηριωμένο, ότι τα σοβαρά μειωμένα επίπεδα υδατανθράκων (π.χ. μυϊκό γλυκογόνο, ηπατικό γλυκογόνο, γλυκόζη του αίματος) συνδέονται με κόπωση και μειωμένη απόδοση. Στην εξαντλητική άσκηση πολλές μελέτες έχουν παρατηρήσει μειωμένα επίπεδα τόσο του ηπατικού όσο και του μυϊκού γλυκογόνου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το σημείο εξάντλησης εμφανίζεται κατά την εξάντληση του ηπατικού γλυκογόνου. Τα αποθέματα του μυϊκού γλυκογόνου εξαντλούνται σε ποσοστό 65-85% σε σχέση με τα αποθέματα του ηπατικού γλυκογόνου που εξαντλούνται 85-95%. Η εξάντληση του ηπατικού γλυκογόνου έχει ως συνέπεια την αποδυνάμωση παραγωγής της ηπατικής γλυκόζης και των συγκεντρώσεων της γλυκόζης του αίματος. Επειδή η γλυκόζη είναι η βασική πηγή ενέργειας για το νευρικό σύστημα, μια σημαντική μείωση στα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μετά από εξάντληση οφείλεται σε ανεπάρκεια γλυκόζης στον εγκέφαλο.

Οι υδατάνθρακες ενισχύουν επίσης την παραγωγή και απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη είναι μια αναβολική ορμόνη, η οποία έχει θετική επίδραση στην πρωτεϊνική σύνθεση των μυών και επίσης καταστέλλει την πρωτεϊνική διάσπαση. Σε μια μελέτη του Πανεπιστημίου του Τέξας βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος ήταν 3 έως 8 φορές υψηλότερα μετά την άσκηση στα άτομα που τους χορηγήθηκαν υδατάνθρακες. Μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυασμός πρωτεΐνης-υδατανθράκων σχεδόν διπλασιάζει την ινσουλινική απόκριση. Μια αναλογία 3:1 ή 4:1 (υδατάνθρακες προς πρωτεΐνη) είναι μια καλή σύσταση.

Ακόμη, η χορήγηση υδατανθράκων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης έντονης άσκησης έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης, επινεφρίνης και αυξητικών ορμονών (Murray et al., 1991). Κατά τη διάρκεια της έντονης άσκησης, λόγω των χαμηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) ενεργοποιείται οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και επινεφρίνης τα οποία έχουν αντιφλεγμονώδη δράση. Ο οργανισμός προκειμένου να αντισταθμίσει αυτή την αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα παράγει προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή σχέση μεταξύ των ορμονών του στρες και των κυτοκινών, είναι πιθανό ότι τα συμπληρώματα υδατανθράκων διατηρώντας υψηλά τα επίπεδα της γλυκόζης του

αίματος θα μετριάζουν την αύξηση της επινεφρίνης και της κορτιζόλης και επομένως και των προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.

Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει επικεντρωθεί σε μεθόδους που διευκολύνουν την πρόσληψη των υδατανθράκων σε μια προσπάθεια να αυξήσουν την οξείδωση των υδατανθράκων και να βελτιώσουν την αθλητική απόδοση.

### 3.2. Πρωτεΐνες

Η πρωτεΐνη αντιπροσωπεύει περίπου το 15% του σωματικού βάρους ενός ατόμου και εκτός από το νερό, είναι το μεγαλύτερο συστατικό στο ανθρώπινο σώμα. Επιτελεί τις ίδιες λειτουργίες τόσο σε άτομα με καθιστική ζωή όσο και σε φυσικά δραστήρια άτομα. Ωστόσο, οι διατροφικές πρωτεϊνικές απαιτήσεις των αθλητών είναι μεγαλύτερες από αυτές των ατόμων με καθιστική ζωή λόγω των αλλαγών στο μεταβολισμό των αμινοξέων που επάγονται μετά από άσκηση. Μια μικρή ποσότητα πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ως καύσιμο κατά την άσκηση. Επιπλέον πρωτεΐνη χρειάζεται για την επιδιόρθωση βλαβών στις μυϊκές ίνες και για την αναδιαμόρφωση του μυϊκού ιστού μετά από έντονη άσκηση.

Επιπρόσθετα, η μυϊκή και η συνολική πρωτεϊνική σύνθεση καταστέλλεται κατά τη διάρκεια της άσκησης. Για παράδειγμα, τρέξιμο για 1 ώρα μπορεί να μειώσει τη μυϊκή πρωτεϊνική σύνθεση κατά 20%. Αύξηση της έντασης και της διάρκειας της άσκησης μπορούν να καταστείλουν ακόμη περαιτέρω την πρωτεϊνική σύνθεση.

Επίσης, η έντονη άσκηση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη διαθεσιμότητα των απαραίτητων αμινοξέων κάτι το οποίο επιβραδύνει τον ρυθμό επιδιόρθωσης και ανάπτυξης των ιστών (Kreider, 1999). Γενικά, τα τρία αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAs, η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη, αυξάνουν την ενέργεια ενώ παράλληλα εμποδίζουν τη διάσπαση των μυϊκών πρωτεϊνών. Επιπλέον, προωθούν τη βιοσύνθεση άλλων αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και βιολογικών αμινών. Τα BCAAs αποτελούν το 1/3 του μυϊκού ιστού και είναι τα πρώτα αμινοξέα που καταβολίζονται λόγω έντονης άσκησης. Η έλλειψη διαθεσιμότητας των BCAAs κατά τη διάρκεια της άσκησης συμβάλει σε κόπωση (Newsholme et al., 1991). Τόσο οι μύες όσο και άλλοι ιστοί περιέχουν μεγάλες ποσότητες αποθηκευμένης πρωτεΐνης. Όταν οι ποσότητες των αμινοξέων δεν είναι επαρκείς, οι πρωτεΐνες των ιστών μπορούν ραγδαίως να διασπαστούν σε αμινοξέα τα οποία χρησιμοποιούνται για να ανατροφοδοτήσουν τη “δεξαμενή των αμινοξέων” τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας ή λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η

πρωτεϊνική σύνθεση κατά την αποκατάσταση μετά την άσκηση ενισχύεται όταν χορηγείται σκεύασμα που περιέχει συνδυασμό υδατανθράκων-πρωτεϊνών.

Τα οφέλη των διατροφικών πρωτεϊνών και αμινοξέων για τους αθλητές είναι τα παρακάτω:

1. Παροχή δομικών μονάδων για διαρθρωτικές, συσταλτικές, ορμονικές, ανοσολογικές, ενζυμικές και άλλες σωματικές πρωτεΐνες.
2. Διέγερση πρωτεϊνοσύνθεσης σε μια κατά τα άλλα καταβολική κατάσταση.
3. Παροχή οξειδωτικού καυσίμου στους σκελετικούς μύες και στα λευκά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια στρες του ανοσοποιητικού.
4. Αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της γλουταθειόνης.
5. Αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου και ενδεχόμενη επούλωση πληγών.
6. Αυξημένα αντισώματα και/ή μειωμένη συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης.
7. Παροχή συμπυκνωμένων θρεπτικών συστατικών

Οι τρεις κύριες πηγές πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής είναι οι εξής: 1) το γάλα, 2) το αυγό και 3) η σόγια. Όμως δεν είναι όλες οι πηγές πρωτεϊνών της ίδιας ποιότητας. Οι πηγές πρωτεΐνης που περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα θεωρούνται πλήρεις πρωτεΐνες ενώ εκείνες που δεν περιέχουν όλα τα αμινοξέα θεωρούνται ελλιπείς (Bucci & Unlu, 1999). Οι πηγές πρωτεϊνών με υψηλότερη συγκέντρωση BCAAs και άλλων ουσιαστικών αμινοξέων είναι υψηλότερης ποιότητας και πιο αποτελεσματικές στην προαγωγή πρωτεϊνικής σύνθεσης (Borsheim et al., 2002). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι μια υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη η οποία περιέχει υψηλότερα ποσά απαραίτητων αμινοξέων όταν συγκρίνεται με άλλες κοινές πηγές πρωτεϊνών (π.χ. αυγό, σόγια). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην προώθηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και την παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (Di Pascuale, 1999). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα βασικό συστατικό των πρωτεϊνών γάλακτος.

### **3.2.1. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί πρωτεϊνών**

Η αντιοξειδωτική δράση των πρωτεϊνών οφείλεται σε σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ικανοτήτων τους να απενεργοποιούν δραστικά είδη οξυγόνου και ελεύθερες ρίζες, να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με προοξειδωτικά μέταλλα μετάπτωσης, να ανάγουν υδροϋπεροξειδία και να εξαλείφουν ενζυμικά συγκεκριμένα οξειδωτικά.

### **3.2.1.α. Απενεργοποίηση προοξειδωτικών μετάλλων**

Τα οξειδοαναγωγικά δραστικά μέταλλα μετάπτωσης όπως ο σίδηρος και ο χαλκός είναι ικανά να καταλύουν την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων σε δραστικά είδη ριζών και είναι σημαντικά προοξειδωτικά. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αναστείλλουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις με το να αλλάζουν τη φυσική θέση των μετάλλων μετάπτωσης (π.χ. διαχωρισμός των μετάλλων από οξειδωτικά ασταθή λιπίδια ή υδροϋπεροξειδία), σχηματίζοντας αδιάλυτα μεταλλικά σύμπλοκα, μειώνοντας τη χημική αντιδραστικότητα των μετάλλων μετάπτωσης και εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των μετάλλων με λιπίδια (Diaz et al., 2003). Οι τροφές περιέχουν πρωτεΐνες των οποίων η συγκεκριμένη λειτουργία είναι να δεσμεύουν μέταλλα ενώ κάποιες άλλες πρωτεΐνες τροφίμων δεσμεύουν μη ειδικά προοξειδωτικά μέταλλα. Πρωτεΐνες των οποίων η βιολογική λειτουργία είναι να δημιουργούν χημικά σύμπλοκα και να αποθηκεύουν ή να μεταφέρουν καταλυτικά αδρανή μέταλλα έχουν βρεθεί στα περισσότερα βιολογικά συστήματα. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών αποτελούν η τρανσφερρίνη, η λακτοσφαιρίνη και η φερρίτινη. Αυτές οι πρωτεΐνες ελέγχουν τη δραστηριότητα του σιδήρου με τη δέσμευση στη λιγότερο ενεργή του κατάσταση και παρεμποδίζοντας στερεοχημικά τις αλληλεπιδράσεις σιδήρου-υπεροξειδίου. Πολλές πρωτεΐνες των οποίων η βιολογική λειτουργία δεν είναι να αποθηκεύουν και να μεταφέρουν μέταλλα, είναι σε θέση να δημιουργούν χημικά σύμπλοκα. Αυτό οφείλεται στα κατάλοιπα αμινοξέων όπως ιστιδίνη, γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ και φωσφορυλιωμένη σερίνη και θρεονίνη τα οποία είναι γνωστό ότι δεσμεύουν μέταλλα. Τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν η καζεΐνη (Diaz et al., 2003, 2005), οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος (Faraji et al., 2004; Tong et al., 2000), οι πρωτεΐνες σόγιας (Faraji et al., 2004) και η αλβουμίνη ορού βοοειδών (Vilieri et al., 2005).

### **3.2.1.β. Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών οξυγόνου**

Τα 20 αμινοξέα των πρωτεϊνών έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ελεύθερες ρίζες, αν η ενέργεια της ρίζας είναι υψηλή (π.χ. ρίζες υδροξυλίου). Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πρωτεϊνών σε οξειδωτικές αντιδράσεις μεσολαβούμενες από ελεύθερες ρίζες, μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να τις δεσμεύουν (Neuzil et al., 1993; Ostdal et al., 2002). Για παράδειγμα, οι ρίζες τυροσίνης που σχηματίζονται στην αλβουμίνη ορού βοοειδών έχουν μεγαλύτερο

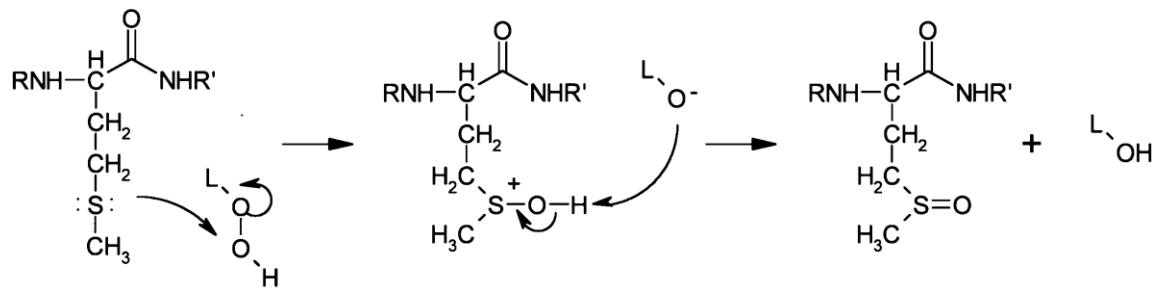
χρόνο ζωής και είναι λιγότερο δραστικές από τις ελεύθερες ρίζες τυροσίνης (Ostdal et al., 1999). Ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής των ριζών τυροσινυλίου στην αλβουμίνη ορού βοοειδών, οφείλεται πιθανώς στην ικανότητα της πρωτεΐνης να μεταφέρει τις ρίζες στην επιφάνεια αμινοξικών καταλοίπων τα οποία είναι θαμμένα στον υδρόφοβο πυρήνα της πρωτεΐνης. Είναι κατανοητό ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της πρωτεΐνης εν μέρει αποδίδεται στην χαμηλότερη δραστικότητα των πρωτεϊνικών ριζών αν αυτές οι ρίζες μεταφερθούν στο εσωτερικό της πρωτεΐνης όπου είναι ανέικανες να αλληλεπιδράσουν με λιπίδια.

Η μεθειονίνη έχει προταθεί ως ένα σημαντικός εξουδετερωτής ελευθέρων ριζών στις πρωτεΐνες σε βιολογικά συστήματα (Levine et al., 1999; Levine et al., 2000; Levine et al., 1996; Stadtman et al., 2003). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κατάλοιπα μεθειονίνης είναι πολύ ασταθή στην οξείδωση και μπορούν να εξουδετερώσουν τις ρίζες πριν επιτεθούν σε άλλα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία είναι σημαντικά για την πρωτεϊνική δομή ή λειτουργία της πρωτεΐνης (Levine et al., 1999; Levine et al., 1996). Για παράδειγμα, η υψηλή συγκέντρωση καταλοίπων μεθειονίνης στη δραστική θέση της γλουταμικής συνθετάσης μπορεί να χρησιμεύσει ως μια ‘τελευταία ευκαιρία’ αντιοξειδωτικής άμυνας, οξειδώνοντας τη μεθειονίνη και όχι άλλα αμινοξέα που είναι σημαντικά για την ενζυμική λειτουργία (Levine et al., 1996).

### **3.2.1.γ. Αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων**

Ένας άλλος αντιοξειδωτικός μηχανισμός των πρωτεϊνών προκύπτει από την ικανότητα τους να ανάγουν τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία σε μη δραστικά λιπιδικά υδροξείδια από μη ριζικές αντιδράσεις (Garner et al., 1998a; Garner et al., 1998b; Pryor et al., 1994; Pryor & Squadrito, 1995). Τα κατάλοιπα μεθειονίνης πιστεύεται ότι παίζουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η HDL των σκύλων, η οποία παρουσιάζει έλλειψη των καταλοίπων μεθειονίνης Met112 και Met148, εμφανίζει ασθενέστερη αναγωγική δραστηριότητα από την ανθρώπινη HDL (Garner et al., 1998a). Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων σε λιπιδικά υδροξείδια περιλαμβάνει την άμεση μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το σουλφίδιο της ομάδας θειοαιθέρα της μεθειονίνης οδηγώντας στην οξείδωση της μεθειονίνης σε σουλφοξείδιο μεθειονίνης (Garner et al., 1998a; Garner et al., 1998b; Panzenbock & Stocker, 2005).





**Εικόνα 15:** Προτεινόμενη αναγωγή δύο ηλεκτρονίων του λιπιδικού υδροϋπεροξειδίου (LOOH) από την ομάδα θειοαιθέρα της μεθειονίνης.

### 3.2.2. Πρωτεΐνες γάλακτος

Τα τελευταία χρόνια, τα συστατικά του γάλακτος έχουν αναγνωριστεί ως λειτουργικά τρόφιμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρήση τους έχει άμεσα και μετρήσιμα αποτελέσματα στην υγεία (Gill et al., 2000). Οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι εμπορικά διαθέσιμες ως πρωτεΐνες πλήρους γάλακτος, καζεϊνικά άλατα και πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Η πρωτεΐνη γάλακτος αποτελείται από περίπου 80% καζεΐνες (α, β, γ και υπότυποι) και 20% πρωτεΐνες ορού γάλακτος (α-λακταλβουμίνη, β-γαλακτοσφαιρίνη, αλβουμίνη ορού βοοειδών, ανοσοσφαιρίνες, λακτοφερρίνη, λακτοϋπεροξειδάση).

Η καζεΐνη παράγεται από αποβουτυρωμένο γάλα με όξινη κατακρήμνιση ή ενζυμική πήξη, πλύση και ξήρανση. Τα καζεϊνικά άλατα παράγονται με κατεργασία του τυροπήγματος καζεΐνης με αλκαλικά άλατα όπως υδροξείδιο του νατρίου ή υδροξείδιο του ασβεστίου, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό καζεϊνικών αλάτων του νατρίου ή ασβεστίου. Τα καζεϊνικά άλατα περιέχουν ~90% πρωτεΐνη. Το συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος που παράγεται με πήξη του γάλακτος με το ένζυμο πυτιάς ή με οξύ, οδηγεί στο διαχωρισμό του τυροπήγματος από τον ορό γάλακτος. Περαιτέρω υπερδιήθηση και ξήρανση παράγει συμπυκνώματα ορού γάλακτος που περιέχουν ~25-80% πρωτεΐνη. Επιπρόσθετη επεξεργασία μπορεί να παράγει απομονωμένα στελέχη πρωτεΐνης ορού γάλακτος που περιέχουν > 90% πρωτεΐνη με χαμηλά ποσά λακτόζης και λιπιδίων.

Τόσο η πρωτεΐνη ορού γάλακτος όσο και καζεΐνη κατατάσσονται ως υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες. Ωστόσο, η καζεΐνη δεν περιέχει τόσο υψηλή συγκέντρωση BCAAs και άλλων αμινοξέων όπως η πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Bucci & Unlu, 1999). Επίσης, η καζεΐνη απελευθερώνεται με βραδύτερο ρυθμό μεταγευματικά, κάτι

το οποίο οδηγεί σε μειωμένη απελευθέρωση αμινοξέων. Έρευνα δείχνει ότι η διαφορά στην πέψη των πρωτεϊνών ή τον ρυθμό απελευθέρωσης των αμινοξέων οδηγεί σε διαφορετικά επίπεδα πρωτεϊνικής σύνθεσης ή διάσπασης (Boirie et al., 1997).

Στις μέρες μας, ο ορός γάλακτος είναι ένα δημοφιλές πρωτεϊνικό συμπλήρωμα που φαίνεται να παρέχει αντιμικροβιακή δράση, ρύθμιση του ανοσοποιητικού και βελτιωμένη μυϊκή δύναμη και προλαμβάνει καρδιαγγειακές ασθένειες και την οστεοπόρωση.

### **3.2.2.1. Πρωτεΐνη ορού γάλακτος**

#### **Γενικά**

Ο ορός γάλακτος, ένα παραπροϊόν της παρασκευής τυριού και τυροπήγματος θεωρούνταν για αρκετό καιρό ένα προϊόν αποβλήτων. Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο Ιπποκράτης επικροτούσε τις θετικές επιδράσεις του ορού γάλακτος στην υγεία, και κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα ο ορός γάλακτος θεωρήθηκε όχι μόνο ως φάρμακο αλλά και ως βάλσαμο για το δέρμα. Στην πραγματικότητα ήταν συχνό συστατικό αλοιφών και φίλτρων για να καταπραΰνει εγκαύματα και να θεραπεύσει διάφορες ασθένειες (Kosikowski, 1982). Η ανακάλυψη του ορού γάλακτος ως ένα λειτουργικό τρόφιμο με διατροφικές εφαρμογές, ανύψωσε τον ορό γάλακτος ως ένα συν-προϊόν στην παρασκευή τυριού (Walzem et al., 2002). Τα συστατικά του ορού γάλακτος περιλαμβάνουν τη β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακταλβουμίνη, την αλβουμίνη ορού βοοειδών, τη λακτοφερρίνη, τις ανοσοσφαιρίνες, τα ένζυμα λακτοϋπεροξειδάσης, τα γλυκομακροπεπτίδια και τη λακτόζη (Walzem et al., 2002). Επιπλέον, ο ορός γάλακτος έχει τη δυνατότητα να δρα ως αντιοξειδωτικός, αντιυπερτασικός, αντικαρκινικός, υπολιπιδαιμικός, αντιϊικός, αντιβακτηριδιακός και χηλικός παράγοντας. Ο πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο ο ορός γάλακτος πιστεύεται ότι ασκεί τη δράση του είναι με την ενδοκυτταρική μετατροπή του αμινοξέος κυστεΐνη σε γλουταθειόνη, ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό. Ένας αριθμός κλινικών ερευνών έχει εφαρμοστεί επιτυχώς χρησιμοποιώντας τον ορό γάλακτος στη θεραπεία του καρκίνου, της ηπατίτιδας Β, των καρδιαγγειακών ασθενειών και της οστεοπόρωσης. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει παρουσιάσει επίσης πλεονεκτήματα στο χώρο της άσκησης (Marshall, 2004).

### 3.2.2.1.α. Παρασκευή πρωτεΐνης ορού γάλακτος

Η πρωτεΐνη που προέρχεται από το πλήρες γάλα βοοειδών, αποτελείται από περίπου 20% πρωτεΐνη ορού γάλακτος. 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 μοσχαριών. Η χυμοσίνη, που αποτελεί το ενεργό ένζυμο της πυτιάς, βοηθά στο πήξιμο του γάλακτος διαχωρίζοντας το σε πηγμένο γάλα για τυρί και σε ορό γάλακτος. Στα νεογέννητα μοσχάρια, η χυμοσίνη βοηθά στη χώνευση και στην απορρόφηση του γάλακτος, ωστόσο, οι ενήλικες αγελάδες δεν έχουν αυτό το ένζυμο.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή στραγγίζεται διαμέσου κοσκίνων από ανοξειδωτο ατσάλι και το πηγμένο γάλα για τυρί που παραμένει κόβεται και θερμαίνεται στους 30°C. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή έπειτα φιλτράρεται στους 45°C και προστίθεται κιτρικό οξύ έτσι ώστε το pH να πέσει στο 3. Το υγρό φιλτράρεται έπειτα στο 1/5 του συνολικού του όγκου με αποτέλεσμα να παράγεται το συμπύκνωμα του ορού γάλακτος το οποίο περιέχει περίπου 80% πρωτεΐνη. Το συμπύκνωμα μπορεί έπειτα να μικροδιηθηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να φτάσει το 95%.

Το τελικό συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος θερμαίνεται και ξηραίνεται με ψεκασμό έτσι ώστε να προκύψει η σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Με τη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να αφαιρεθεί η λακτόζη και τα λίπη από το συμπύκνωμα. Πολλοί παραγωγοί υδρολύουν (μέσω θέρμανσης ή χρήσης περιοριστικών ενζύμων) την πρωτεΐνη ορού γάλακτος με σκοπό να παρέχουν περισσότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα στο τελικό προϊόν αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική αξία της πρωτεΐνης καθώς διευκολύνεται η απορρόφηση.

Η εμπορική επιτυχία της πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικών συμπληρωμάτων ως πρωταρχικών προϊόντων και όχι ως παραπροϊόντων της παραγωγής τυριού. Οι παρασκευαστές φροντίζουν στο να διατηρήσουν τη βιολογική δράση και τη φυσική δομή της

πρωτεΐνης στο τελικό προϊόν. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε επεξεργασία υπό χαμηλές θερμοκρασίες και δεν εκτίθενται στις κυμαινόμενες μεταβολές του pH ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των φυσικών τους δομών.

### **3.2.2.1.β. Βιολογικά συστατικά της πρωτεΐνης ορού γάλακτος**

#### ***Αμινοξικό περιεχόμενο***

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με διάφορες πηγές πρωτεϊνών όπως σόγια, καλαμπόκι, σιτάρι και γλουτένη (Walzem et al., 2002). Τα αμινοξέα που βρίσκονται στην πρωτεΐνη ορού γάλακτος απορροφούνται και χρησιμοποιούνται αποτελεσματικότερα, σε σχέση με διαλύματα ελεύθερων αμινοξέων (Daenzer et al., 2001). Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεϊνών περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs, ~26%)-λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη (Bos et al., 2000; Dillar et al., 2002). Τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη, είναι σημαντικοί στην ανάπτυξη των ιστών και την επιδιόρθωση. Η λευκίνη διαδραματίζει ξεχωριστό ρόλο στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και έχει αναγνωριστεί ως βασικό σήμα στην έναρξη του μονοπατιού της σύνθεσης μυϊκών πρωτεϊνών (Anthony et al., 2001). Εμπλέκεται στην αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόσδεση του mRNA στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα. Αυτό το καλά ρυθμιζόμενο βήμα εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης (eIF's). Αν και τα ακριβή σήματα για την απόκριση στον σκελετικό μυ δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, τα αμινοξέα διεγείρουν την έναρξη μέσω σχηματισμού ενός συμπλέγματος από αυτούς τους παράγοντες (eIF's), και καθιστούν δυνατή την πρόσδεση του mRNA στη ριβοσωμική υπομονάδα επιτρέποντας την πρωτεϊνική σύνθεση να προχωρήσει. Επιπλέον, η λευκίνη ενισχύει τη φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεϊνικής κινάσης S6 (70kDa) και έτσι διεγείρει την πρωτεϊνική σύνθεση στον σκελετικό μυ με ενίσχυση τόσο της δραστηριότητας όσο και της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Anthony et al., 2001).

#### ***Λακτοφερρίνη***

Η λακτοφερρίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη δέσμευσης σιδήρου, είναι ένα μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό, το οποίο βρίσκεται στο κλάσμα του ορού γάλακτος καθώς

και στο πρωτόγαλα. Η λακτοφερρίνη του ορού γάλακτος αποτελείται από περίπου 689 αμινοξέα ενώ η ανθρώπινη λακτοφερρίνη αποτελείται από 691 αμινοξέα (Pierce et al., 1991). Η λακτοφερρίνη του ορού γάλακτος αποτελείται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα με δύο θέσεις πρόσδεσης για τα ιόντα σιδήρου. Πριν την επεξεργασία η λακτοφερρίνη των βοοειδών είναι μόνο 15-20% κορεσμένη με σίδηρο. Η λακτοφερρίνη με μειωμένο σίδηρο, που ορίζεται ως η λακτοφερρίνη που έχει λιγότερο από 5% σίδηρο, αναφέρεται ως απολακτοφερρίνη. Το ποσοστό της λακτοφερρίνης στις σκόνες πρωτεΐνης ορού γάλακτος κυμαίνεται από 0,35-2%.

### **Ανοσοσφαιρίνες**

Μια ανοσοσφαιρίνη (Ig) είναι ένα αντίσωμα ή μια γ-σφαιρίνη. Υπάρχουν πέντε κατηγορίες αντισωμάτων-IgA, IgD, IgE, IgG και IgM. Το αντίσωμα IgG αποτελεί το 75% των αντισωμάτων σε έναν ενήλικα. Το κλάσμα του ορού γάλακτος περιέχει μια σημαντική ποσότητα ανοσοσφαιρινών, περίπου 10-15% του συνόλου των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Μια *in vitro* μελέτη έδειξε ότι το αντίσωμα IgG που προέρχεται από το γάλα βοοειδών μπορεί να καταστέλλει την ανθρώπινη λευκοκυτταρική πολλαπλασιαστική απόκριση στα T κύτταρα. Επίσης, έδειξαν ότι τα επίπεδα του αντισώματος IgG κυμαίνονται από 0,6-0,9 mg/ml και είναι ικανό να προσδώσει ανοσία που μπορεί να μεταφερθεί στους ανθρώπους (Kulczycki et al., 1985). Μελέτες έχουν δείξει ότι το νωπό γάλα από μη ανοσοποιημένες αγελάδες περιέχει ειδικά αντισώματα για τον ανθρώπινο ροταϊό καθώς και αντισώματα για βακτήρια όπως *E. Coli*, *Salmonella enderiditis*, *S. Typhimurium* και *Shigella flexneri* (Losso et al., 1993; Yolken et al., 1985).

### **Β-λακτοσφαιρίνη**

Η β-λακτοσφαιρίνη αντιπροσωπεύει το μισό της συνολικής πρωτεΐνης του ορού γάλακτος βοοειδών, ενώ το ανθρώπινο γάλα δεν περιέχει καθόλου β-λακτοσφαιρίνη. Πέραν του ότι είναι μια πηγή βασικών και διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέων, μια πρωτεΐνη πρόσδεσης ρετινόλης έχει εντοπιστεί στη δομή της. Αυτή η πρωτεΐνη, ένας φορέας μικρών υδροφοβικών μορίων συμπεριλαμβανομένου του ρετινοϊκού οξέος, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει αποκρίσεις του λεμφικού (Guimont et al., 1997).

### ***A-λακταλβουμίνη***

Η α-λακταλβουμίνη είναι μια από τις κύριες πρωτεΐνες που υπάρχει τόσο στο ανθρώπινο όσο και στο γάλα βοοειδών. Αντιστοιχεί σε περίπου 20-25% του συνόλου των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και περιέχει μια σημαντική ποικιλία αμινοξέων. Σε μια μελέτη σε επίμνες, η α-λακταλβουμίνη τόσο στην μητρική όσο και στην υδρολυμένη της κατάσταση, αύξησε την απόκριση των αντισωμάτων μετά από διέγερση από αντιγόνο (Bounous & Kongshavn, 1982). Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η α-λακταλβουμίνη έχει άμεση επίδραση στη λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων καθώς και στην καταστολή Τ-κυτταροεξαρτώμενων και μη αποκρίσεων (Bounous & Kongshavn, 1985).

### ***Λακτοϋπεροξειδάση***

Ο ορός γάλακτος περιέχει πολλά είδη ενζύμων όπως υδρολάσες, τρανσφεράσες, λυάσες, πρωτεάσες και λιπάσες. Η λακτοϋπεροξειδάση, ένα σημαντικό ένζυμο στο κλάσμα του ορού γάλακτος, είναι το πιο άφθονο ένζυμο και η πλειοψηφία του καταλήγει στον ορό γάλακτος μετά τη διαδικασία τυροπήγματος. Αποτελεί το 0,25-0.5 % της συνολικής πρωτεΐνης στον ορό γάλακτος. Έχει την ικανότητα να καταλύει συγκεκριμένα μόρια, όπως την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bjorck, 1978). Αυτό το ενζυμικό σύστημα καταλύει την υπεροξειδωση του θειοκυανικού και κάποιων αλογονιδίων (π.χ. ιώδιο, βρώμιο), που τελικά οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων που αναστέλλουν και/ή σκοτώνουν έναν αριθμό βακτηριακών ειδών (Kussendrager & van Hooijdonk, 2000). Κατά τη διάρκεια της παστερίωσης, η λακτοϋπεροξειδάση δεν απενεργοποιείται κάτι που υποδηλώνει τη σταθερότητά του ως συντηρητικό.

### ***Γλυκομακροπεπίδιο (GMP)***

Το γλυκομακροπεπίδιο, αναφέρεται και ως μακροπεπίδιο καζεΐνης. Είναι μια πρωτεΐνη παρούσα στον ορό γάλακτος σε ποσοστό 10-15% λόγω της δράσης της χυμοσίνης στην καζεΐνη κατά την παρασκευή του τυριού. Το GMP είναι παρόν μόνο όταν χρησιμοποιείται χυμοσίνη κατά την επεξεργασία. Είναι πλούσιο σε αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και στερείται αρωματικών αμινοξέων όπως η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη. Είναι μία από τις λίγες πρωτεΐνες στη

φύση που στερείται φιανυλαλανίνη, καθιστώντας την ασφαλής για άτομα με φαινυλκετονουρία (PKU).

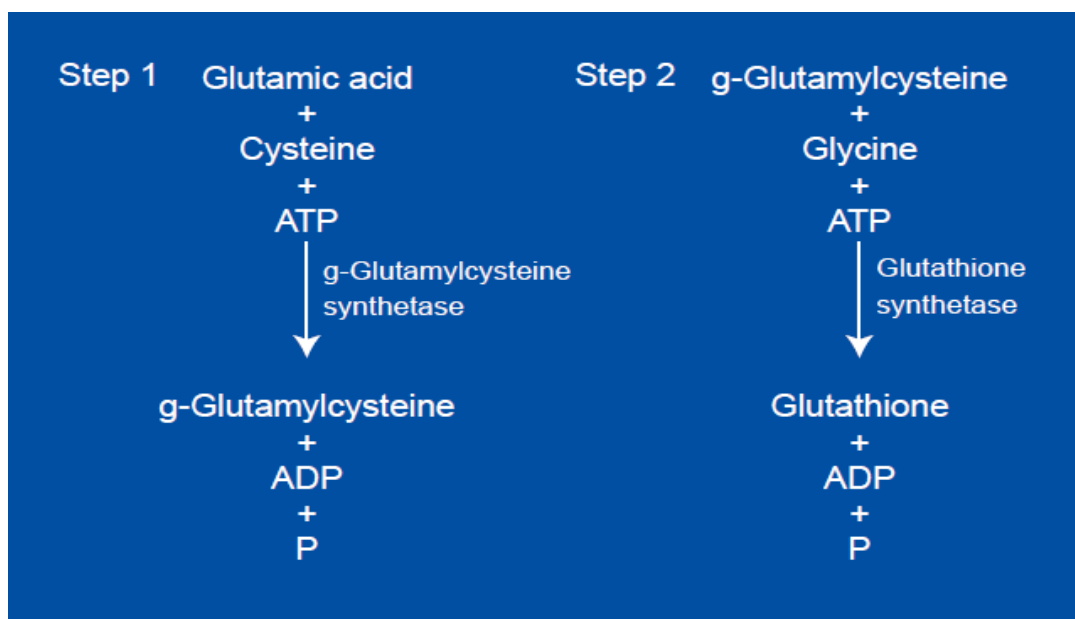
### ***Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)***

Η αλβουμίνη ορού βοοειδών είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη που αποτελεί το 10-15% της συνολικής πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Είναι μια πηγή απαραίτητων αμινοξέων αλλά υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες για την θεραπευτική της δράση.

### **3.2.2.1.γ. Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος**

Ο ορός γάλακτος έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση πιθανώς με τη συνεισφορά σε πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες βοηθούν τη σύνθεση της GSH, ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό (Walzem et al., 2002). Η GSH αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμικό και κυστεΐνη (Εικόνα 15). Η κυστεΐνη περιέχει μια ομάδα θειόλης που χρησιμεύει ως ένας δραστηκός αναγωγικός παράγοντας στην πρόληψη της οξειδωσης και της βλάβης των ιστών. Ως αντιοξειδωτικό, η GSH είναι πιο δραστηκή στην ανηγμένη της μορφή. Η ριβοφλαβίνη, η νιασιναμίδη και η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι σημαντικοί συμπαράγοντες στην αναγωγή της γλουταθειόνης (Marz, 2002).

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



**Εικόνα 16:** Σύνθεση της γλουταθειόνης από κυστεΐνη, γλουταμικό και γλυκίνη.

Μελέτες πάνω στη λακτοφερρίνη, έχουν δείξει την ικανότητα της να ενεργοποιεί τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα, να επάγει τη δραστικότητα του παράγοντα διέγερσης αποικιών και να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων (Nishiya & Horwitz, 1982; Gahr et al., 1991; Sawatzki & Rich, 1989; McCormick et al., 1991). Η λακτοφερρίνη επίσης φαίνεται να έχει αντιϊκές, αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες. Οι αντιμικροβιακές της επιδράσεις φαίνεται να είναι πιο ισχυρές σε οργανισμούς που απαιτούν σίδηρο για να αντιγραφούν, καθώς η λακτοφερρίνη έχει την μοναδική ικανότητα να δεσμεύει τον σίδηρο με έναν τρόπο που αφαιρεί από τους μικροοργανισμούς αυτή την θρεπτική ουσία για ανάπτυξη (Shah, 2000). Επιπλέον, η λακτοφερρίνη έχει την ικανότητα να απελευθερώνει την εξωτερική μεμβράνη Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, το συστατικό λιποπολυσακχαρίτης, λειτουργώντας έτσι ως αντιβιοτικό (Tomita et al., 2002). Η λακτοφερρίνη εμφανίζει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Σε μια μελέτη σε επίμυες, η λακτοφερρίνη είχε την ικανότητα να ρυθμίζει τα επίπεδα του TNF και της IL-6, ρυθμίζοντας έτσι τη φλεγμονή και επομένως τη θνησιμότητα (Machnicki et al., 1993).

Επιπρόσθετα, η α-λακταλβουμίνη μπορεί να δεσμεύει βαρέα μέταλλα (Sundberg et al., 1999), μειώνοντας το οξειδωτικό στρες λόγω αυτών των σίδηρο δεσμευτικών της ιδιοτήτων (Ha & Zemel, 2003).



### 3.2.2.1.δ Κλινικές ενδείξεις για την πρωτεΐνη ορού γάλακτος

#### **Καρκίνος**

Τα συμπυκνώματα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχουν μελετηθεί εκτενώς στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου. Η διέγερση σύνθεσης της γλουταθειόνης φαίνεται να είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός ανοσο-διαμόρφωσης. Τα πρόδρομα αμινοξέα της γλουταθειόνης που είναι διαθέσιμα στον ορό γάλακτος φαίνεται ότι θα μπορούσαν να 1) αυξάνουν τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στους ιστούς, 2) να ενισχύουν την ανοσία και 3) να αποτοξινώνουν ενδεχόμενα καρκινογόνα (Bounous, 2000). Ακόμη, οι σίδηρο-δεσμευτικές ικανότητες του ορού γάλακτος ίσως να συμβάλλουν στις αντικαρκινικές τις ιδιότητες, καθώς ο σίδηρος μπορεί να δρα ως μεταλλαξιγόνος παράγοντας προκαλώντας οξειδωτική βλάβη στους ιστούς (Weinberg, 1995).

Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν εξετάσει τις επιδράσεις του ορού γάλακτος και των συστατικών του συμπεριλαμβανομένων της λακτοφερρίνης και της α-λακταλβουμίνης (Sekine et al., 1997; Smithers et al., 1998; Tsuda et al., 1998,2000; Yoo et al., 1998; Hakkak et al., 2000,2001; Kuhara et al., 2000). Σε μελέτες σε ζώα όπου καρκίνος το παχέος εντέρου επάχθηκε, ο ορός γάλακτος παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης όγκων (Sekine et al., 1997; Tsuda et al., 1998; ; Hakkak et al., 2000; Kuhara et al., 2000). Ο Yoo et al. (1998) έδειξε ότι η λακτοφερρίνη έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη μετάσταση πρωτογενών όγκων σε ποντικούς με καρκίνο. Η αλβουμίνη του ορού βοοειδών εμφάνισε αναστολή της ανάπτυξης ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vitro* (Laurson et al., 1990). Σε μια άλλη μελέτη, ο κλασματοποιημένος ορός γάλακτος εμφάνισε την ικανότητα να προλαμβάνει και να θεραπεύει την στοματική βλεννογονίτιδα μετά από χημειοθεραπεία με 5-φθοριοουρακίλη (Clarke et al., 2002). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής του παράγοντα ανάπτυξης όγκων (TGF)-β ο οποίος μειώνει το βασικό πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων.

#### **Αντιμικροβιακές ιδιότητες**

Τα επίπεδα λακτοφερρίνης στο πλάσμα έχουν βρεθεί ότι αυξάνονται λόγω απελευθέρωσης τους από τα ουδετερόφιλα κατά τη λοίμωξη, τη φλεγμονή, την

ανάπτυξη όγκων και την υπερφόρτωση σιδήρου (Steijns & van Hooijdonh, 2000). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η λακτοφερρίνη παίζει έναν άμεσο ρόλο στην άμυνα του οργανισμού κατά παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι άτομα πιο ευαίσθητα σε λοιμώξεις έχουν χαμηλότερα επίπεδα λακτοφερρίνης (Boxer et al., 1982; Breton-Gorius et al., 1980).

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τις επιδράσεις της επιδράσεις της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην εξάλειψη του *Helicobacter pylori* (Early et al., 2001; Di Mario et al., 2003). Το *H. pylori* είναι ευρέως αποδεκτό ως ο αιτιολογικός παράγοντας για πάνω από το 90% των περιπτώσεων έλκους του δωδεκαδάκτυλου. Σε μια ανοιχτή μελέτη 150 ατόμων με διαγνωσμένη λοίμωξη από *H. Pylori*, χορηγήθηκαν στους ασθενείς αντιβιοτικά σε συνδυασμό με χορήγηση λακτοφερρίνης (Di Mario et al., 2003). Βρέθηκε ότι υπήρχε 100% εξάλειψη του *H. Pylori* στην ομάδα που τους χορηγήθηκαν τα αντιβιοτικά σε συνδυασμό με την λακτοφερρίνη ενώ στην ομάδα που τους χορηγήθηκαν μόνο αντιβιοτικά υπήρχε 76,9% εξάλειψη.

Σε μια μικρή μελέτη σε 12 παιδιά που βρέθηκαν θετικά σε στρεπτόκοκκο, τους χορηγήθηκε συνδυασμός ερυθρομυκίνης με λακτοφερρίνη. Μετά από 15 ημέρες θεραπείας τα επίπεδα του στρεπτόκοκκου στην ομάδα που έλαβε το συνδυασμό των αντιβιοτικών με τη λακτοφερρίνη ήταν χαμηλότερα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο τα αντιβιοτικά (Ajello et al., 2002).

Η λακτοφερρίνη εμφανίζει βακτηριοκτόνο δράση απέναντι σε έναν αριθμό οργανισμών όπως *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* και *Micrococcus luteus* (Shah, 2000; Batish et al., 1988; Payne et al., 1990; Saito et al., 1991; Yamauchi et al., 1992). Όταν είναι σε συνδυασμό με τη λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη είναι πιο ισχυρός βακτηριοστατικός παράγοντας ενάντια στους μικροοργανισμούς *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* (Shah, 2000; Suzuki et al., 1989). Η λακτοφερρίνη έχει επίσης αντιμυκητιακή δράση κατά του *Candida albicans* (Jones et al., 1994).

### **Καρδιαγγειακές ασθένειες**

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν συνδέσει την διατροφή με τρόφιμα υψηλού λίπους με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών ασθενειών (CVD). Επειδή οι CVD συνδέονται με έναν αριθμό άλλων παραγόντων όπως αυξημένη ηλικία,

γενετικοί παράγοντες, καθιστική ζωή, παχυσαρκία, κατανάλωση αλκοόλ, η ποιότητα του διατροφικού λίπους θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Το γάλα αποτελείται από περισσότερα από 12 είδη λίπους όπως σφιγγολιπίδια, ελεύθερες στερόλες, χοληστερόλη και ελαϊκό οξύ (82). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη γάλακτος και των προϊόντων του μειώνει την αρτηριακή πίεση και τον κίνδυνο υπέρτασης (83-85).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε μια ομάδα 20 υγιών ενήλικων ανδρών, μελετήθηκε κατά πόσο γάλα που έχει υποστεί ζύμωση και έχει ενισχυθεί με συμπλήρωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος θα μπορούσε να επηρεάσει τα λιπίδια του ορού και την αρτηριακή πίεση (82). Μετά από 8 εβδομάδες, τα επίπεδα της HDL ήταν υψηλότερα ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της συστολικής πίεσης χαμηλότερα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

### ***Γαστροεντερικές διαταραχές***

Ο ορός γάλακτος, τα συστατικά του και κάποια αμινοξέα όπως η γλουταμίνη εμφανίζουν κάποια λειτουργικότητα στο έντερο. Παράγοντες όπως τα γλυκομακροπεπτίδια παρουσιάζουν πρεβιοτική και/ή προβιοτική δράση και επίσης διεγείρουν την απελευθέρωση της χοληκυστοκίνης από τα εντερικά κύτταρα και αναστέλλουν τη δέσμευση τοξινών (DillarCJ et al., 2002). Η λακτόζη, ένα άλλο συστατικό του ορού γάλακτος μπορεί να υδρολυθεί ενζυμικά προς σχηματισμό γάλακτο-ολιγοσακχαριτών που χρησιμοποιούνται εύκολα από τα δισχιδοβακτήρια, συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη λειτουργία του πεπτικού σωλήνα (Shah, 2000).

Σε μια μελέτη από τους Rosaneli et al. (2002), οι αρουραίου που τρεφόντουσαν με συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρουσίασαν μείωση 41% σε ελκώδεις αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από κατάποση αιθανόλης, ενώ μείωση της τάξης του 71% παρατηρήθηκε μετά από επαναλαμβανόμενες δόσεις ορού γάλακτος.

### ***Παχυσαρκία***

Ο ορός γάλακτος μπορεί να προσφέρει ένα διατροφικό πλεονέκτημα προς την επίτευξη μιας επιθυμητής σύστασης σώματος. Η απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να αποτελείται από 95% πρωτεΐνη, μετά την απομάκρυνση του λίπους και της λακτόζης, και να περιέχει πολύτιμα μέταλλα και βιταμίνες. Μελέτες δείχνουν ότι το ασβέστιο (Zemel et al., 2000;2002; Zemel, 2003; Carruth & Skinner, 2001; Davies et al., 2000) και τα πολύτιμα μέταλλα που παρέχονται από τα

γαλακτοκομικά προϊόντα (Zemel et al., 2000; Zemel, 2003; Carruth & Skinner, 2001; Shi et al., 2001; Iin et al., 2000) μειώνουν τη συσσώρευση σωματικού λίπους και επιταχύνουν την απώλεια βάρους και λίπους κατά τη διάρκεια ενεργειακού περιορισμού. Το ασβέστιο πιστεύεται ότι επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό καθώς το ενδοκυτταρικό ασβέστιο ρυθμίζει τον μεταβολισμό λιπιδίων των λιποκυττάρων και την αποθήκευση τριγλυκεριδίων (Zemel, 2003).

Ο φυσιολογικός μηχανισμός με τον οποίο οι υψηλές προσλήψεις ασβεστίου μειώνουν την αποθήκευση λίπους στα λιποκύτταρα έχει διευκρινιστεί σε ανθρώπινα λιποκύτταρα και σε μοντέλα ποντικών από τους Zemel et al. (2000; 2003). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι ασβεστιοτροπικές ορμόνες (π.χ. παραθυρεοειδής ορμόνη, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D) που αποκρίνονται στις φτωχές σε ασβέστιο δίαιτες προωθούν την αποθήκευση λιπώδους ιστού και η καταστολή αυτών των ορμονών μέσω διαίτας υψηλής σε ασβέστιο εμποδίζει την παχυσαρκία.

### **Οστεοπόρωση**

Το γάλα έχει προταθεί ως θρεπτικό τρόφιμο που βοηθά στην πρόληψη της οστεοπόρωσης λόγω της βιοδιαθεσιμότητάς του σε ασβέστιο (Silverwood, 2003). Έρευνες ξεκίνησαν για να εξετάσουν τα διαφορετικά συστατικά του γάλακτος και να καθορίσουν αν κάποιο συγκεκριμένο είναι υπεύθυνο για τις οστεο-προστατευτικές επιδράσεις. Μελέτες τόσο *in vitro* όσο και σε μοντέλα ζώων έδειξαν ότι η βασική πρωτεΐνη γάλακτος (MBP), ένα συστατικό του ορού γάλακτος, έχει την ικανότητα να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστικών κυττάρων καθώς και να καταστέλλει την οστική επαναρρόφηση (Toba et al., 2000; Takada et al., 1996;1997). Η MBP προέρχεται από κλασματοποιημένο ορό γάλακτος μέσω ρητίνης ανταλλαγής κατιόντων. Η ολική συγκέντρωση της MBP είναι 98% και περιέχει λακτοφερρίνη, λακτοϋπεροξειδάση και άλλα δευτερεύοντα συστατικά. Αρκετές μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι τόσο η πρωτεΐνη ορού γάλακτος όσο και η κλασματοποιημένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος είχαν την ικανότητα να αυξάνουν την μηριαία αντοχή των οστών (Takada et al., 1997; Kato et al., 2000).

Κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί για να προσδιορίσουν τις επιδράσεις της MBP στον οστικό μεταβολισμό (Toba et al., 2001; Aoe et al., 2001; Yamamura et al., 2001). Σε μια μελέτη των Toba et al. (2001), σε 30 υγιή άτομα δόθηκε ρόφημα που περιείχε 300 mg MBP. Μετά από 16 ημέρες τα επίπεδα της οστεοκαλσίνης και του προπεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου I (PICP) αυξήθηκαν, υποδεικνύοντας

αυξημένο σχηματισμό οστών. Η οστεοκαλσίνη και το PICP είναι βιοχημικοί δείκτες που απελευθερώνονται από τους οστεοβλάστες για να αξιολογήσουν το σχηματισμό οστών. Σε μια παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 33 υγιείς γυναίκες (Aoe et al., 2001), βρέθηκε ότι στην ομάδα που χορηγήθηκαν 40 mg MBP παρατηρήθηκε αυξημένη οστική πυκνότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι Yamamura et al. (2002), σε 30 γυναίκες χορήγησαν 40 mg MBP για μια περίοδο 6 μηνών και βρήκαν ότι αυξήθηκε σημαντικά η ακτινική οστική πυκνότητα.

### **Άσκηση**

Τα συμπληρώματα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος καταναλώνονται ευρέως λόγω της υψηλής τους ποιότητας και της υψηλής συγκέντρωσης σε BCAAs (Kawase et al., 2000). Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μπορεί να περιέχουν έως και 26% BCAAs (Walzem et al., 2002; Bos et al., 2000), τα οποία είναι αποτελεσματικά υποστρώματα για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η λευκίνη δρα σαν σηματοδοτικό μόριο για την έναρξη της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Anthony et al., 2001; Kimball et al., 2002). Έχει υποτεθεί ότι η ποιότητα μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης για την ενίσχυση της μυϊκής υπερτροφίας και δύναμης σχετίζεται με το περιεχόμενο της σε λευκίνη (Ha et al., 2003). Το αμινοξικό προφίλ των διατροφικών πρωτεϊνών επηρεάζει τη χρήση αζώτου και η κακής ποιότητας διατροφικές πρωτεΐνες έχει δειχθεί ότι αυξάνουν τις απώλειες αζώτου και περιορίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση (Tome & Bos, 2000; Millward & Pacy, 1995).

Ενώ η μέτρια άσκηση ενισχύει την ανοσία (Millward & Pacy, 1995), η έντονη προπόνηση έχει αποδειχθεί ότι στρεσάρει το ανοσοποιητικό σύστημα (Mackinnon, 2000; Nieman, 1998). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η αυξημένη φλεγμονώδης δραστηριότητα φαίνεται να συμβάλουν στη διαταραχή της ανοσοποιητικής δραστηριότητας σε υπερ-προπονημένους αθλητές. Ακόμη, η μυϊκή απόδοση και η αποκατάσταση μπορεί να διαταραχθεί από το οξειδωτικό στρες (Gohil et al., 1998; Sastre et al., 1992; Sen et al., 1994). Η λακτοφερρίνη και η λακτοφερρικίνη, δύο δευτερεύουσες πρωτεΐνες που υπάρχουν στον ορό γάλακτος, λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το σίδηρο. Η λακτοφερρίνη είναι μόνο από 8-30% κορεσμένη στη μητρική της μορφή, μια κατάσταση που διευκολύνει τη δέσμευση του σιδήρου και την επακόλουθη αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης και των οξειδωτικών αντιδράσεων. Ο ορός γάλακτος επίσης αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα με τη συμβολή του σε πρωτεΐνες πλούσιες σε

κυστεΐνη, οι οποίες είναι καθοριστικές για τη σύνθεση της γλουταθειόνης (Dillar et al., 2002). Οι Lands et al. (1999) πρότειναν ότι αυξημένη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, όπως φάνηκε από την αύξηση των επιπέδων της GSH στα λεμφοκύτταρα, είναι ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη βελτιωμένη μυϊκή απόδοση που παρατηρήθηκε στη μελέτη τους.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

---

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος *in vitro***

### **2.1.1 Γενικά**

Οι ROS αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού (Halliwell, 2001). Περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες όπως η  $O_2^{\cdot-}$ , η  $OH^{\cdot}$ , η  $RO_2^{\cdot}$  καθώς και μη ρίζες όπως το  $H_2O_2$  (Halliwell, 2001). Ένα ποσό ROS είναι απαραίτητο για φυσιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου της φαγοκύττωσης (Dupré-Crochet et al., 2013), της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Halliwell, 2001), του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του μεταβολισμού, της απόπτωσης και της μυϊκής συστολής (Linnane et al., 2002). Κάποιες από τις ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η φλεγμονή, τα υπεροξειδιοσωμάτια και το κυτόχρωμα P450 (Valko et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ROS ελέγχονται από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Όταν υπάρχει διαταραχή μεταξύ της προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ της πρώτης, τότε οδηγούμαστε σε οξειδωτικό στρες, μια παθοφυσιολογική κατάσταση, που εμπλέκεται σε οξειδωτική βλάβη μακρομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) (Halliwell, 2001; Mylonas & Kouretas, 1999), δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού (Schneider & Tiidus, 2007), μυϊκή βλάβη (Nikolaidis et al., 2007) και κόπωση (Meeus et al., 2013).

Μια ποικιλία αντιοξειδωτικών συστημάτων είναι ενεργή στον οργανισμό και περιλαμβάνει τόσο ενζυμικούς όσο και μη ενζυμικούς μηχανισμούς (Powers & Lennon, 2000). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν την SOD, την CAT και την GPX (Powers & Jackson, 2008). Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν την βιταμίνη A, τη βιταμίνη C, τη βιταμίνη E, τα φλαβονοειδή, την GSH, το ουρικό οξύ και την βιλιρουβίνη (Wu et al., 2004).

Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η αντιοξειδωτική άμυνα και η προστασία του οργανισμού από τις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για αναζήτηση φυσικών πηγών αντιοξειδωτικών. Κάποιες πρωτεΐνες από συγκεκριμένα τρόφιμα έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν δραστικά είδη οξυγόνου. Για παράδειγμα, η μυοϊνδική πρωτεΐνη χοίρου (Saiga et al.,



2003), η σόγια και η ζελατίνη (Park et al., 2005), οι πρωτεΐνες γάλακτος όπως η καζεΐνη (Rival et al., 2001) και τελικά η πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Hu et al., 2003; Lajoie et al., 2001; Pena-Ramos & Xiong, 2003; Kerasioti et al., 2012) έχουν δειχθεί ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένα δημοφιλές διατροφικό συμπλήρωμα που αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα (Bartfay, et al., 2003; Kerasioti et al., 2012). Κάποια από τα συστατικά της πρωτεΐνης ορού γάλακτος εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Για παράδειγμα, η α-λακταλβουμίνη μπορεί να δεσμεύει χηλικά βαριά μέταλλα οδηγώντας σε μείωση του οξειδωτικού στρες λόγω των σίδηρο-δεσμευτικών ιδιοτήτων της (Ha & Zemel, 2003). Επιπλέον, λόγω του πλούσιου περιεχομένου της σε κυστεΐνη, ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα λόγω ενδοκυτταρικής της μετατροπής σε γλουταθειόνη (Marshall, 2004).

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών καθώς και της αναγωγικής δύναμης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0-6.24 mg πρωτεΐνης/ml) *in vitro* και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με την πρωτεΐνη βοδινού (0-4.96 mg πρωτεΐνης/ml), τη σόγια (0-5.9 mg πρωτεΐνης/ml) και την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0-11.8 mg πρωτεΐνης/ml).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH).
- 2) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας του 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ (ABTS).
- 3) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας OH<sup>·</sup>.
- 4) Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.
- 5) Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης.

## **2.1.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1.2.α. Αντιδραστήρια**

Τα χημικά αντιδραστήρια 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ [(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid), ABTS], νιτροκυανό του τετραζολίου (nitroblue tetrazolium, NBT), μεθοσουλφονική φαιναζίνη (phenazine methosulfate, PMS), 2-δεοξυριβόζη (2-deoxyribose), νικοτιναμίδιο αδενινο

νουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), χλωριούχος σίδηρος (ferric chloride), το διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v) και το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA) και το χημικό αντιδραστήριο 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany). Το χημικό αντιδραστήριο σιδηροκυανιούχο κάλιο (potassium ferricyanide) αποκτήθηκε από την εταιρία Applichem.

#### **2.1.2.β. Πρωτεϊνικά σκευάσματα**

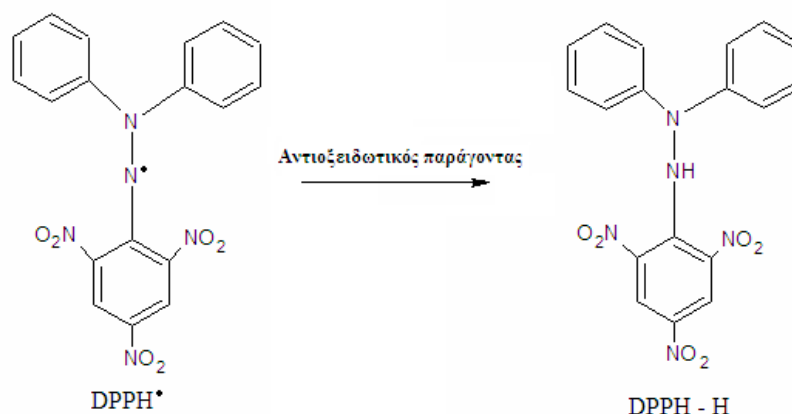
- 1) Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (78 g/ 100 g)
- 2) Πρωτεΐνη βοδινού (62 g/ 100 g)
- 3) Σόγια (73.8 g/ 100 g)
- 4) Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (73.8 g/ 100 g)

#### **2.1.2.γ. Μέθοδοι**

##### **2.1.2.γ.ι. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH<sup>•</sup>**

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH<sup>•</sup> πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>). Η ρίζα DPPH<sup>•</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη

(DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17:** Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης) (900μL), 100 μM ρίζας DPPH<sup>•</sup> (50μL) και η πρωτεΐνη (50μL) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH<sup>•</sup> (100 μM) μαζί με την μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 517 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH<sup>•</sup> (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσης της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_d) / A_0 \times 100$$

A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

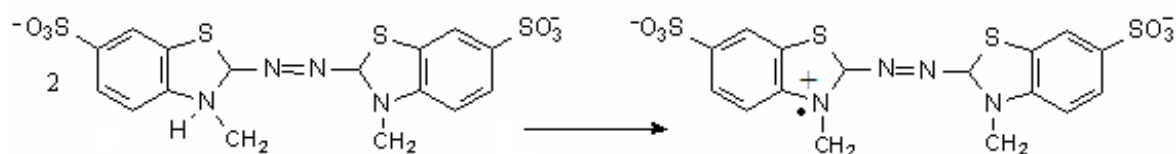
A<sub>d</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

### 2.1.2.γ.ii. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH<sup>•</sup>, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH<sup>•</sup>, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδάσων (Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού (ABTS<sup>•+</sup>) μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL H<sub>2</sub>O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μL της πρωτεΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H<sub>2</sub>O με 1 mM ABTS, 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελούσε το τυφλό. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_d) / A_0 \times 100$$

A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A<sub>d</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

### **2.1.2.γ.iii. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH<sup>•</sup>**

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH<sup>•</sup> έγινε με τη μέθοδο των Chung et al.,1997.

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH<sup>•</sup> μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που

δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton και διασπάται σε μαλονδιαλδεΐδη (Gutteridge, 1984,1987). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου εκτιμάται ως ο ρυθμός αναστολής της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες υδροξυλίου.

Πιο αναλυτικά, 75  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνης αυξανόμενων συγκεντρώσεων προστέθηκαν σε 450  $\mu\text{l}$  sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), 150  $\mu\text{l}$  2-deoxyribose (10 mM), 150  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$ - EDTA (10 mM), 525  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) και ακολουθεί επώαση για 4 h στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 750  $\mu\text{l}$  TCA (2.8 %) και 750  $\mu\text{l}$  TBA (1 %) και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 10 min. Ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας  $\text{OH}\cdot$  υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{A}_0 - \text{A}_\delta) / \text{A}_0 \times 100$$

$\text{A}_0$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm

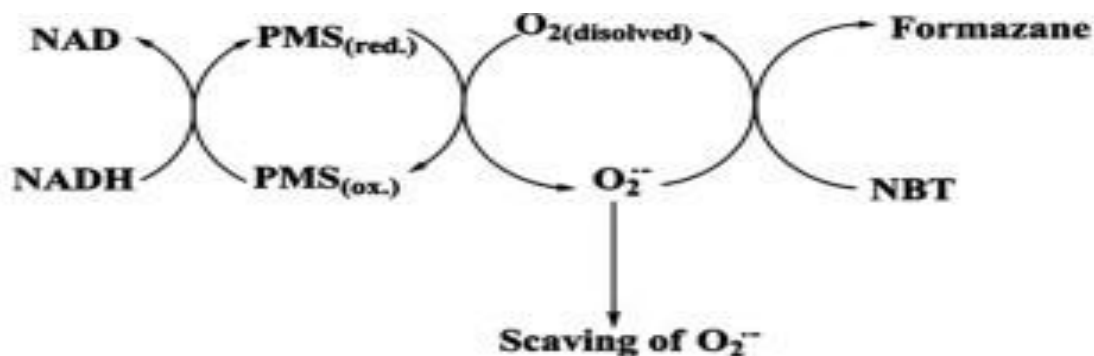
$\text{A}_\delta$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm

#### **2.1.2.γ.iv. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $\text{O}_2\cdot^-$**

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας  $\text{O}_2\cdot^-$  πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004.

Η ρίζα  $\text{O}_2\cdot^-$  έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το

$O_2^{\cdot -}$  μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT  $^{2+}$  με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19:** Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ ) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμίδιο αδενινοκλεοσιδίου (NADH).

Πιο αναλυτικά, σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστίθενται 500  $\mu$ l NBT (300 $\mu$ M), 500  $\mu$ l NADH (468 $\mu$ M) και 250  $\mu$ l πρωτεΐνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 500  $\mu$ l PMS (60 $\mu$ M). Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και ακολούθει φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60 $\mu$ M) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας  $O_2^{\cdot -}$  υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

$A_o$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

$A_d$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

### **2.1.2.γ.v. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης**

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον  $Fe^{3+}$  και τον ανάγουν σε  $Fe^{2+}$ , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη διαλύθηκε σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Προστέθηκαν 2.5 ml από το διάλυμα του δείγματος μας σε 2.5 ml potassium ferricyanide (1%) και τα δείγματα μας επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 2.5 ml TCA (10%) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Στο υπερκείμενο (2.5 ml) προστίθενται 2.5 ml απιονισμένου νερού και 500 μl χλωριούχου σιδήρου (0.1 %) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 700 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

### **2.1.3. 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 mean  $\pm$  SEM.

#### 2.1.4. Αποτελέσματα

##### 2.1.4.α. Ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών

Όλες οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες εξουδετέρωσαν τις ρίζες DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$  και OH $\cdot$  με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Γράφημα 1A-C). Ωστόσο, η ρίζα O $_2^{\cdot-}$  εξουδετερώθηκε μόνο από την πρωτεΐνη βοδινού (Γράφημα 1D).

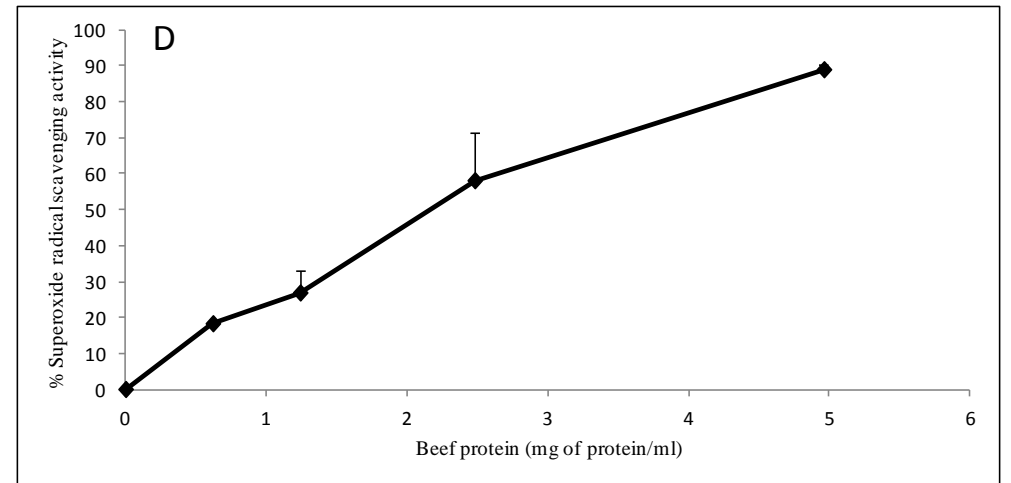
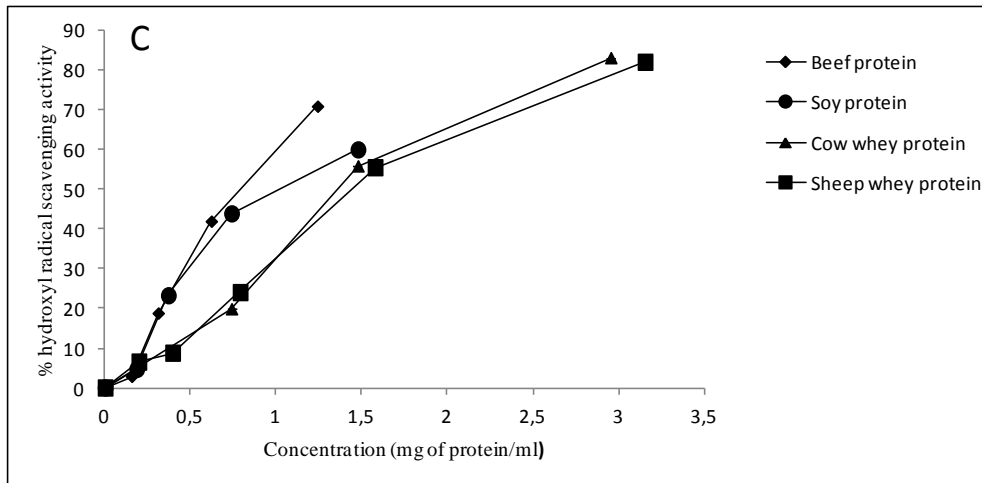
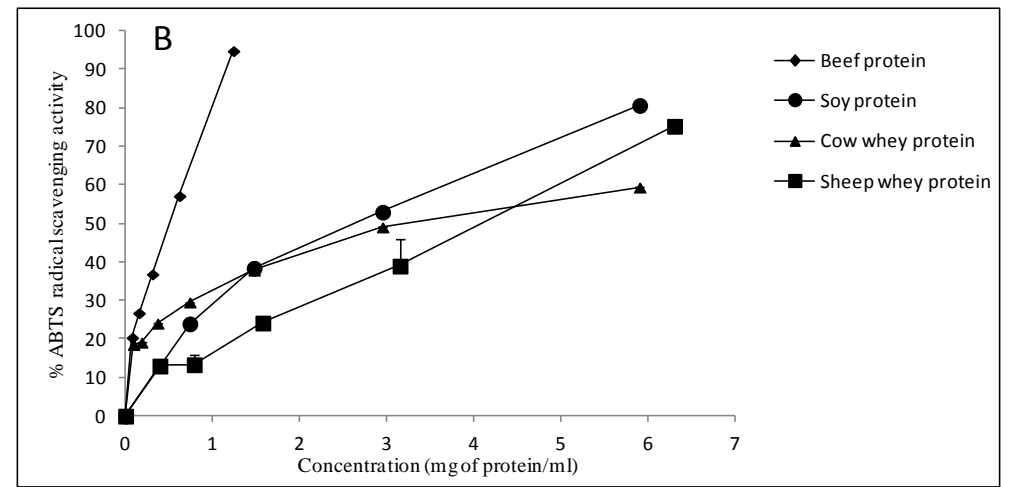
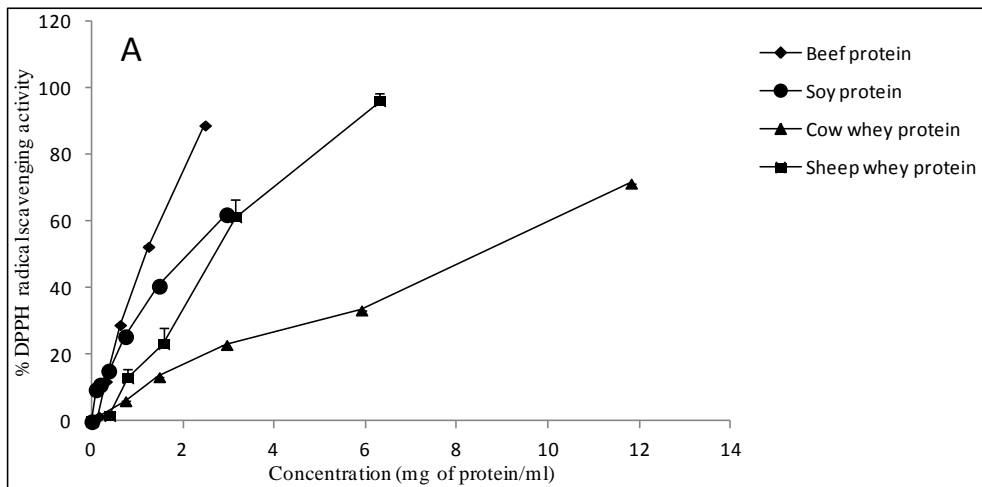
Για κάθε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε η τιμή IC $_{50}$ , η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50% (Πίνακας 3). Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC $_{50}$  τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για την εκάστοτε πρωτεΐνη.

Όσον αφορά τη ρίζα DPPH $\cdot$ , η σειρά δραστηκότητας των πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη: Πρωτεΐνη βοδινού (IC $_{50}$ =1,3mg/ml) > Πρωτεΐνη σόγιας (IC $_{50}$ =2,2mg/ml) > Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =3,1mg/ml) > Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =8,2mg/ml). Όσον αφορά τη ρίζα ABTS $^{+\cdot}$ , η σειρά δραστηκότητας των πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη: Πρωτεΐνη βοδινού (IC $_{50}$ =0,6 mg/ml) > Πρωτεΐνη σόγιας (IC $_{50}$ =3,1mg/ml) > Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =3,9 mg/ml) > Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =4,1mg/ml). Για τη ρίζα OH $\cdot$  η σειρά δραστηκότητας των πρωτεϊνών είναι η εξής: Πρωτεΐνη βοδινού (IC $_{50}$ =0,85mg/ml) > Πρωτεΐνη σόγιας (IC $_{50}$ =1,1mg/ml) > Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =1,7mg/ml) > Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC $_{50}$ =1,8mg/ml). Μόνο η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε ανασταλτική δράση απέναντι στη ρίζα O $_2^{\cdot-}$  με τιμή IC $_{50}$ = 2,5 mg/ml.

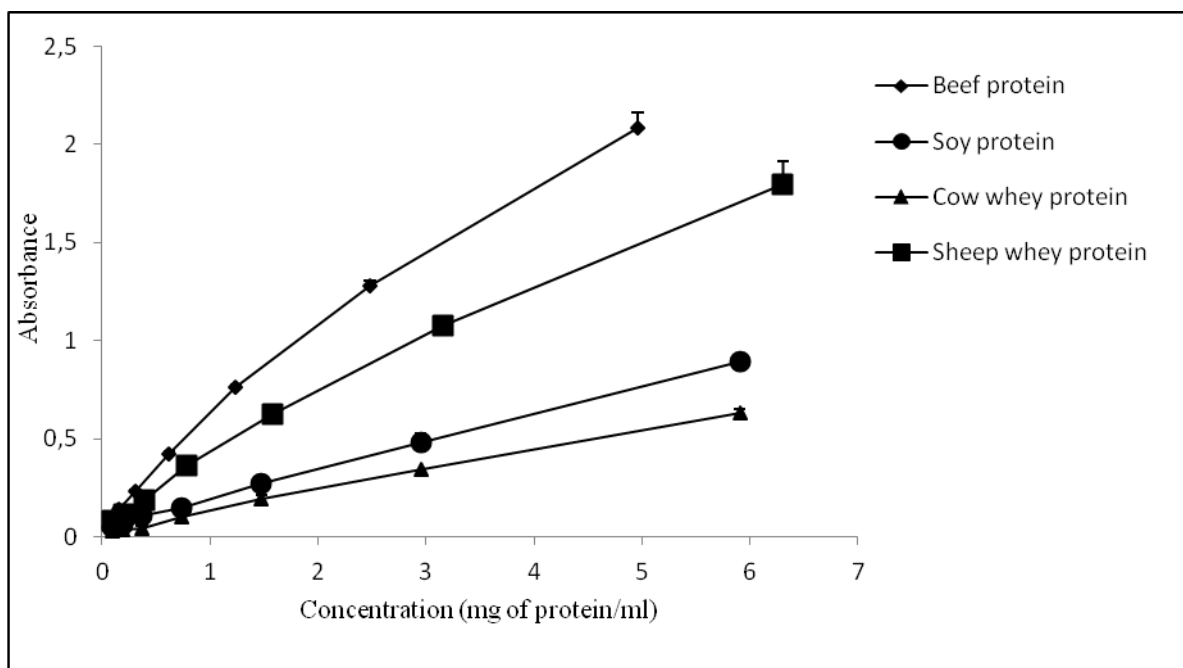
##### 2.1.4.β. Αποτελέσματα αναγωγικής δύναμης

Για τη μέθοδο της αναγωγικής δύναμης προσδιορίστηκε η τιμή RP $_{0.5AU}$ , η συγκέντρωση που δίνει απορρόφηση 0.5 στα 700 nm (Γράφημα 2). Η σειρά δραστηκότητας για τις πρωτεΐνες είναι η εξής: Πρωτεΐνη βοδινού (RP $_{0.5AU}$ =0,9 mg/ml) > Αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (RP $_{0.5AU}$ =1,3 mg/ml) > Πρωτεΐνη

σόγιας (**RP<sub>0.5AU</sub>=4,6 mg/ml**) > Αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (**RP<sub>0.5AU</sub>=4,8 mg/ml**).



**Γράφημα 1:** Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της πρωτεΐνης βοδινού, της πρωτεΐνης σόγιας, της αιγοπρόβειας και της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζυλίου (DPPH<sup>•</sup>) (A), στη ρίζα του 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS<sup>•+</sup>) (B), στη ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) (C) και στη ρίζα σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (D). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.



**Γράφημα 2:** Η αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης βοδινού, της πρωτεΐνης σόγιας, της αιγοπρόβειας και της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

**Πίνακας 4:** Οι τιμές IC<sub>50</sub> (mg of protein/ml) και RP<sub>0.5AU</sub> για την πρωτεΐνη βοδινού, την πρωτεΐνη σόγιας, την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος.

Proteins	DPPH <sup>•a</sup>	ABTS <sup>•+a</sup>	OH <sup>•a</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-a</sup>	Reducing power <sup>a</sup>
	IC <sub>50</sub> (mg of protein/ml)	IC <sub>50</sub> (mg of protein/ml)	IC <sub>50</sub> (mg of protein/ml)	IC <sub>50</sub> (mg of protein/ml)	RP <sub>0.5AU</sub>
<b>Beef protein</b>	1.3 $\pm$ 0.17*	0.6 $\pm$ 0.03*	0.85 $\pm$ 0.07*	2.5 $\pm$ 0.3*	0.9 $\pm$ 0.04*
<b>Soy protein</b>	2.2 $\pm$ 0.44*	3.1 $\pm$ 1.4*	1.1 $\pm$ 0.47*	-	3.1 $\pm$ 1.7*
<b>SWP</b>	3.1 $\pm$ 0.09*	4.1 $\pm$ 0.21*	1.8 $\pm$ 0.28*	-	1.3 $\pm$ 0.06*
<b>CWP</b>	8.2 $\pm$ 0.77*	3.9 $\pm$ 0.13*	1.7 $\pm$ 0.14*	-	4.8 $\pm$ 0.03*

SWP: sheep whey protein. CWP: cow whey protein.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

\*P < 0.05

### 2.1.5. Συζήτηση

Η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, μια παθοφυσιολογική κατάσταση η οποία συνδέεται με πολλές ασθένειες (Valko et al., 2007). Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι εξοπλισμένοι με ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας για να αντιμετωπίσουν τις ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, αλλά και οι εξωγενείς πηγές αντιοξειδωτικών είναι σημαντικές. Στην παρούσα μελέτη συγκρίναμε την *in vitro* αντιοξειδωτική δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος με άλλες πρωτεΐνες (πρωτεΐνη βοδινού, πρωτεΐνη σόγιας, αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος που χρησιμοποιούνται συχνά ως συμπληρώματα διατροφής για μυϊκή ανάπτυξη).

Αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στις ρίζες DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, OH<sup>•</sup> και O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Στη συνέχεια η ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος συγκρίθηκε με εκείνη της πρωτεΐνης βοδινού, της πρωτεΐνης σόγιας και της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της πρωτεΐνης βοδινού, της σόγιας, της αγελαδινής και της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος είναι 62, 73.8, 73.8 and 78 g/100 g αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εμφάνισε μια δοσοεξαρτώμενη ικανότητα εξουδετέρωσης και ήταν πιο αποτελεσματική (IC<sub>50</sub>=3.1 mg πρωτεΐνης/ml) από την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC<sub>50</sub>=8.2 mg πρωτεΐνης/ml). Η πρωτεΐνη σόγιας ήταν πιο δραστική από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (IC<sub>50</sub>=2.2 mg πρωτεΐνης/ml). Ωστόσο, η πρωτεΐνη βοδινού ήταν η πιο δραστική μεταξύ των εξεταζόμενων πρωτεϊνών. Σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε συγκέντρωση 1 mg/ml ανέστειλε τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> κατά 70%. Αυτή η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ήταν πιο αποτελεσματική από τη δική μας εξαιτίας του γεγονότος ότι ήταν υδρολυμένη (Kamau, 2011). Επιπλέον, στη μέθοδο ABTS, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εξουδετέρωσε τη ρίζα με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο και εμφάνισε παρόμοια δράση (IC<sub>50</sub>=4.1 mg πρωτεΐνης/ml) με την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος (IC<sub>50</sub>=3.9 mg πρωτεΐνης/ml) απέναντι στη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Η πρωτεΐνη σόγιας και σε αυτή τη μέθοδο ήταν πιο δραστική από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (IC<sub>50</sub>=3.1 mg πρωτεΐνης/ml). Ωστόσο, όπως και στη μέθοδο DPPH, η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης. Εκτός από τις ρίζες DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup>, εξετάστηκε και η ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στις ρίζες OH<sup>•</sup> και O<sub>2</sub><sup>•-</sup> που είναι παρούσες στους ζωντανούς

οργανισμούς. Συγκεκριμένα, οι ρίζες  $\text{OH}\cdot$  είναι πολύ δραστικές και μπορούν να βλάψουν όλους τους τύπους μακρομορίων (υδατάνθρακες, λιπίδια, αμινοξέα). Αυτές οι ρίζες αντιδρούν με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλούν θραύση στους κλώνους οδηγώντας σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα (Halliwell, 2001). Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εξουδετέρωσε τη ρίζα  $\text{OH}\cdot$  με μια τιμή  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50}=1.8$  mg πρωτεΐνης/ml) παρόμοια με αυτή της αγελαδινής πρωτεΐνης ορού γάλακτος ( $\text{IC}_{50}=1.7$  mg πρωτεΐνης/ml). Όπως στις μεθόδους DPPH και ABTS, η πρωτεΐνη βοδινού είχε την χαμηλότερη τιμή  $\text{IC}_{50}$  απέναντι στη ρίζα  $\text{OH}\cdot$ . Οι ρίζες  $\text{O}_2\cdot^-$  έχουν παρατηρηθεί ότι θανατώνουν κύτταρα, απενεργοποιούν ένζυμα και αποικοδομούν το DNA, κυτταρικές μεμβράνες και πολυσακχαρίτες. Αυτές οι ρίζες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και ενδεχομένως άλλων ευπαθών ουσιών (Halliwell, 2001). Η πρωτεΐνη βοδινού ήταν η μόνη πρωτεΐνη που εξουδετέρωσε τη ρίζα  $\text{O}_2\cdot^-$  και η τιμή  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50}=2.5$  mg πρωτεΐνης/ml) ήταν η υψηλότερη σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Το γεγονός ότι μόνο μία από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες εξουδετέρωσε τη ρίζα  $\text{O}_2\cdot^-$  μπορεί να εξηγηθεί από το χαμηλό ρυθμό αντίδρασης αυτής της ρίζας με αμινοξέα καθώς και από τον μικρό χρόνο ημιζωής της (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Εκτός από την ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, η αναγωγική δύναμη των εξεταζόμενων πρωτεϊνών μελετήθηκε. Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα, καθώς υποδεικνύει ότι οι ουσίες είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα διαδικασιών λιπιδικής υπεροξειδωσης, ώστε να μπορούν να δρουν ως πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά (Chanda & Dave, 2009). Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εμφάνισε αυξημένη αναγωγική δύναμη. Η αναγωγική της δύναμη ήταν μεγαλύτερη ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}}=1.3$  mg πρωτεΐνης/ml) από την αγελαδινή πρωτεΐνη ορού γάλακτος ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}}=4.8$  mg πρωτεΐνης/ml) και την πρωτεΐνη σόγιας ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}}=3.1$  mg πρωτεΐνης/ml). Όπως και στις μεθόδους εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, η πρωτεΐνη βοδινού εμφάνισε τη μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη ( $\text{RP}_{0.5\text{AU}}=0.9$  mg πρωτεΐνης/ml).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η πρωτεΐνη βοδινού ήταν η πιο δραστική με τιμές  $\text{IC}_{50}$  να κυμαίνονται από 0.6-2.5 mg πρωτεΐνης/ml. Η υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών της πρωτεΐνης βοδινού πιθανώς οφείλεται στο αμινοξικό της περιεχόμενο. Έχει αναφερθεί ότι πρωτεΐνες με μεγάλη αντιοξειδωτική δράση, έχουν υψηλό περιεχόμενο σε αμινοξέα που είναι ασταθή σε

οξειδωση και έτσι μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν επιτεθούν σε άλλα κατάλοιπα αμινοξέων τα οποία είναι σημαντικά για την πρωτεϊνική δομή ή λειτουργία (Elias et al., 2008).

Η αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος μπορεί να οφείλεται σε στο πλούσιο περιεχόμενο της σε κυστεΐνη που ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα λόγω ενδοκυτταρικής της μετατροπής σε γλουταθειόνη (Marshall, 2004). Ακόμη, η αντιοξειδωτική της δράση μπορεί να οφείλεται σε κάποιο από τα συστατικά της. Για παράδειγμα, η α-λακταλβουμίνη μπορεί να δεσμεύει χηλικά βαριά μέταλλα οδηγώντας σε μείωση του οξειδωτικού στρες λόγω των σίδηρο-δεσμευτικών ιδιοτήτων της (Ha & Zemel, 2003).

Επομένως, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει την ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και μπορεί να προστατεύει τα μακρομόρια όπως τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες.

## **2.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην μυϊκή κυτταρική σειρά C2C12 και την ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926**

### **2.2.1. Γενικά**

Ο σκελετικός μυς είναι επιρρεπής σε βλάβη από ROS, ακόμη και κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες όπως η άσκηση (Nikolaidis et al., 2008). Ο σκελετικός μυς έχει την ικανότητα να αυξάνει το ρυθμό της χρήσης οξυγόνου κατά τη διάρκεια συστολής. Κατά τη διάρκεια έντονης σωματικής δραστηριότητας το υψηλό ποσοστό κατανάλωσης οξυγόνου στους σκελετικούς μύες μπορεί να προκαλέσει ελλιπή αναγωγή του οξυγόνου και διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, που οδηγούν στην παραγωγή ROS (Hood et al., 2012). Μαζί με το μονοξείδιο του αζώτου και τα προϊόντα παραγωγής του, τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου προκαλούν οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε μυϊκή βλάβη. Τόσο η μυϊκή βλάβη όσο και το επαγόμενο από άσκηση οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με μυϊκή κυτταρική απόπτωση (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). Την ίδια χρονική στιγμή, η κόπωση, που είναι σύμπτωμα της σκελετικής κυτταρικής μυϊκής βλάβης, έχει επίσης

συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες (McClung et al., 2010). Λόγω του γεγονότος ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να ευθύνεται για μυϊκό πόνο και κόπωση καθώς και σκελετική μυϊκή βλάβη, έχει προταθεί ότι συμπληρώματα αντιοξειδωτικών μπορούν να βελτιώσουν το πρόβλημα (Kerasioti et al., 2012).

Το ενδοθήλιο απλώνεται σε όλο το αγγειακό σύστημα και αποτελείται από μια στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενδοθηλιακή κυτταρική δομή και η λειτουργική ακεραιότητα είναι σημαντικές στη διατήρηση του αγγειακού τοιχώματος και της κυκλοφοριακής λειτουργίας. Εκτός από το ρόλο τους ως ένας επιλεκτικός φραγμός διαπερατότητας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ικανά να επιτελούν μια ποικιλία μεταβολικών και συνθετικών λειτουργιών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν με φυσικά και χημικά ερεθίσματα στην κυκλοφορία και ρυθμίζουν την ομοιόσταση, τις ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Αυτά τα κύτταρα ασκούν σημαντικές παρακρινείς και ενδοκρινείς δράσεις μέσω της επίδρασης τους στα λεία μυϊκά κύτταρα ή στα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια. Η κυτταρική βλάβη του ενδοθηλίου είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως της αθηροσκλήρωσης, της απώλειας της μεμβρανικής λειτουργίας και της θρόμβωσης (Sumpio et al., 2002). Η υπερβολική παραγωγή ROS μπορεί να υπερβαίνει την ικανότητα των ενζυμικών και μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών και έτσι συμβάλλει σε αγγειακές ασθένειες με επαγωγή της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί οξεία ενδοθηλιακές δυσλειτουργίες μέσω πολλών μονοπατιών. Οι ROS μπορούν να ενεργοποιούν φωσφολιπάσες ή κυτταρικούς αγγειοφόρους μέσω οξειδωτικών τροποποιήσεων, που με τη σειρά τους επηρεάζουν μεταγενέστερους στόχους όπως πρωτεΐνες πρόσδεσης ακτίνης και μόρια προσκόλλησης (Kamata & Hirata, 1999; Natarajan, 1995). Επίσης, οι ROS παρουσία υπεροξειδικής δισμουτάσης οδηγούν σε παραγωγή  $H_2O_2$ , το οποίο μπορεί να διαχυθεί ταχέως σε όλο το κύτταρο και αντιδρά με ομάδες κυστεΐνης σε πρωτεΐνες και αλλάζουν τη λειτουργία τους (Rhee, 2006). Έτσι, κάτω από παρατεταμένη σηματοδότηση ROS, τα ενδοθηλιακά κύτταρα χάνουν την ακεραιότητά τους, οδηγούνται σε γήρανση και αποκολλώνται περνώντας στην κυκλοφορία (Woywodt et al., 2002).

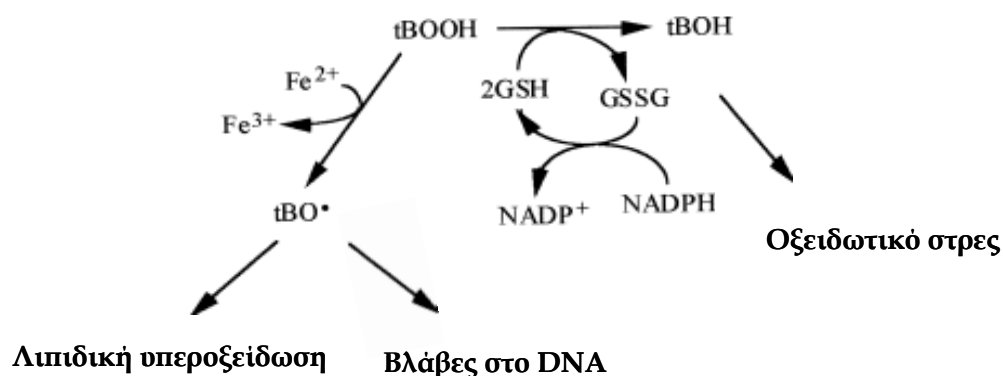
Λαμβάνοντας υπόψη τις επιβλαβείς επιδράσεις των ROS και πόσο σημαντική είναι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας ενός οργανισμού για την καταπολέμηση των βλαβερών επιδράσεων τους, εξετάσαμε την επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0-6.24 mg πρωτεΐνης/ml) στη μυϊκή κυτταρική σειρά



C2C12 και την ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926 απέναντι στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από τον οξειδωτικό παράγοντα τριτ-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο (tBHP). Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής και τα επίπεδα των TBARS, της GSSG, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της TAC φασματοφωτομετρικά.

### 2.2.1.α. Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP

Ο οξειδωτικός παράγοντας τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BHP) είναι ένα οργανικό υδροπεροξειδίο. Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών στα κύτταρα (Sies and Summer, 1975; Alía et al., 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του t-BHP που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 20. Έχει παρατηρηθεί ότι ο οξειδωτικός παράγοντας t-BHP οξειδώνει την GSH, μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Sies and Summer, 1975; Martín et al., 2000; Lima et al., 2006). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα τα  $Fe^{2+}$  οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών  $tBO^{\bullet}$  (Martín et al., 2000; Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες  $tBO^{\bullet}$  (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του t-BHP με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξείδωση (Alía et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Εικόνα 20) (Martín et al., 2000; Latour et al., 1995).



**Εικόνα 20:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BHP).

## 2.2.2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.2.2.a. Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μύσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (Grand Island, NY). Ο οξειδωτικός παράγοντας τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (tert-butyl-hydroperoxide, tBHP), τα χημικά αντιδραστήρια 2,4-δινιτροφαινυλαδραζίνη (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH), 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), νικοτινάμιδο φωσφορικό δινουκλεοτιδίου αδενίνης (NADPH), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η 2-βινυλοπυριδίνη, το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης, το αντιδραστήριο Bradford, οι χρωστικές mercury orange και 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού (2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA), η ουρία και ο οξικός αιθυλεστέρας αποκτήθηκαν Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA), το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και το χημικό αντιδραστήριο 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany). Το κιτ κυτταρικού πολλαπλασιασμού (XTT) αγοράστηκε από την εταιρία Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

### 2.2.2.β. Μέθοδοι

#### 2.2.2.β.i. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρακάτω μελέτη ήταν τα μυϊκά κύτταρα C2C12 (μυοβλάστες ποντικού) και τα κύτταρα EA.hy926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

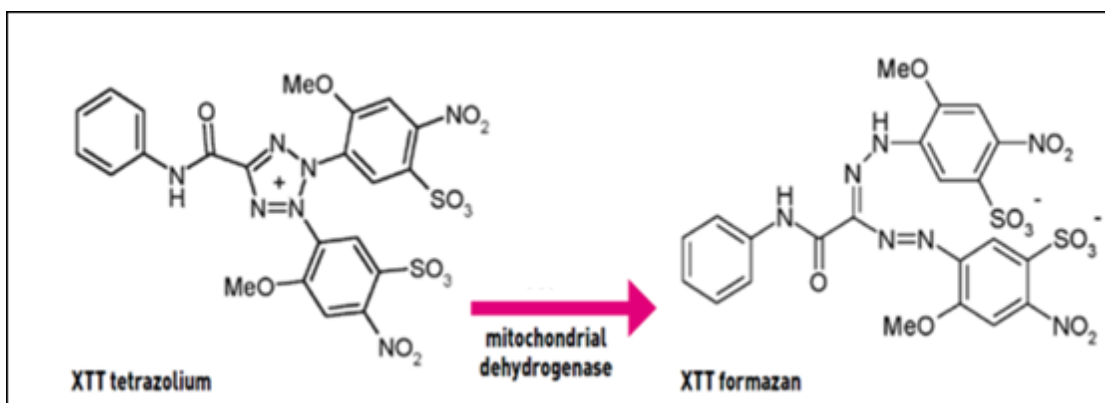
Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο

με 10% ορό FBS μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι πλήρης από κύτταρα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

### **2.2.2.β.ii. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο XTT**

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP, τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις που βρέθηκε ότι εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση *in vitro* (0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg πρωτεΐνης/ml). Η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα που επιλέχθηκε (0.3 mM) δεν ήταν κυτταροτοξική για το χρονικό διάστημα της επώασης 30 min για τα κύτταρα C2C12 και της 1 h για την κυτταρική σειρά EA.hy926 ωστόσο προκαλούσε επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις tBHP (0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mM) για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης.

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



**Εικόνα 21:** Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση  $10^4$  κυττάρων/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 h στους  $37^{\circ}\text{C}$  και σε 5%  $\text{CO}_2$  προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg πρωτεΐνης/ml) ή του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP (0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mM) σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12, 6.24 mg πρωτεΐνης/ml), επώαστηκαν για 24 h. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 μετά την προσθήκη του tBHP (0.3 mM) επώαστηκαν για 30 min και τα ενδοθηλιακά κύτταρα για 1 h. Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. (Το μείγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη ορού γάλακτος ή τον tBHP και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ή του tBHP επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη

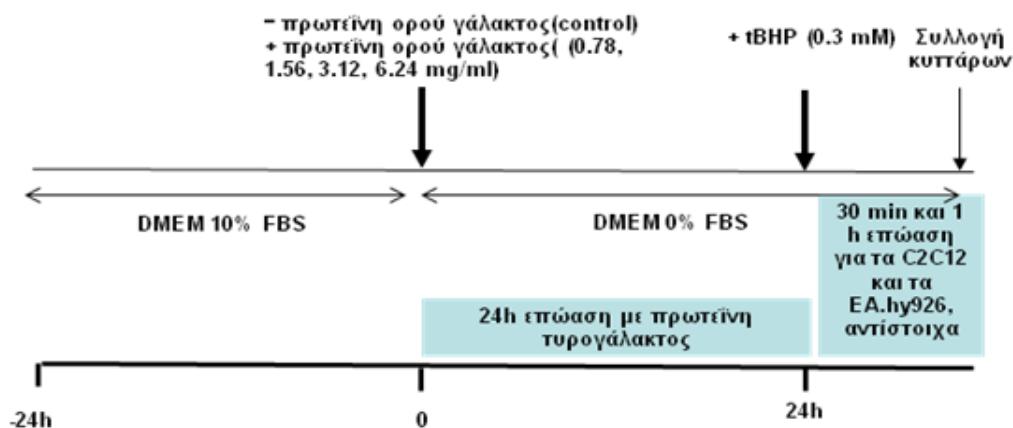
χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του tBHP έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της πρωτεΐνης ορού γάλακτος ή του tBHP στην κυτταρική αύξηση των κυττατικών σειρών C2C12 και EA.hy 926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

### **2.2.2.β.iii. 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-BHP**

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 22. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργήθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS και σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό των TBARS, της GSSG, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της TAC με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες και 10 ml για τις 75cm<sup>2</sup> φλάσκες), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (500 μl για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες και 1 ml για τις 75cm<sup>2</sup> 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 tBHP (0.3 mM). Τα μυϊκά C2C12 κύτταρα μετά την προσθήκη του tBHP (0.3 mM) επωάζονται για 30 min ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για 1 h. Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (500 μl για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες και 1 ml για τις 75cm<sup>2</sup> φλάσκες) (0.25%), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:1 (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS (0,01 M με pH 7,4) για τον προσδιορισμό των δεικτών του

οξειδωτικού στρες (GSH, ROS, TBARS, GSSG, πρωτεϊνικά καρβονύλια, TAC). Για τις μεθόδους προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της TAC ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10sec.

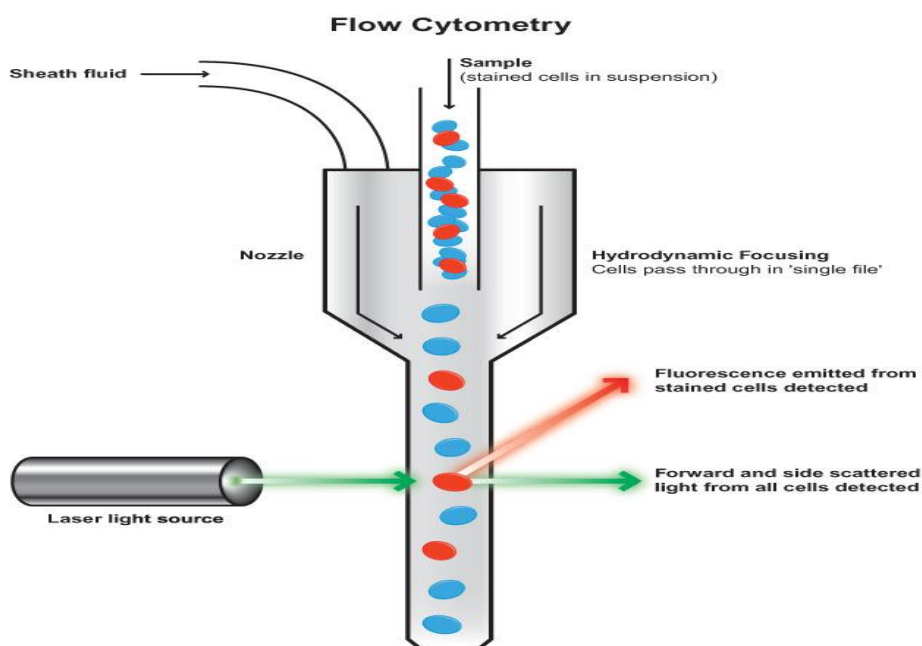


**Εικόνα 22:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα μυϊκά C2C12 και τα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του t-BHP. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

#### 2.2.2.β.ιγ. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

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

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



**Εικόνα 23:** Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με μία ή περισσότερες ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται



απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάστηκε ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4°C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150 μl PBS και επωάζονται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15 μl) (40μM) ή της χρωστικής DCF-DA (15 μl) (10μM), για τον προσδιορισμό της GSH ή των ROS αντίστοιχα, στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί πλύση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 μl PBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250 μl PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με έναν ρυθμό 1000 γεγονότων/sec. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

#### **2.2.2.β.v. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS**

Τετρακόσια μL κυτταρικού αιωρήματος αναμειγνύεται με 500 μL διαλύματος 35% TCA και 500 μL διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 mL διαλύματος 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυνώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 mL διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, 1 mL του κάθε δείγματος φυγοκεντρείται στα 15000 g για 3 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

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

$A_{\delta}$ : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

$A_0$ : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

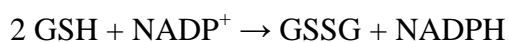
$\epsilon_{530\text{MDA}}$  ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονυλαλδεϋδης.

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

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

#### 2.2.2.β.vi. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG βασίζεται στην μέθοδο των Reddy et al. (2004). 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 (Εικόνα 35). 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:



Πιο αναλυτικά, αρχικά σε 50  $\mu\text{L}$  κυτταροπλασματικού αιωρήματος (pH 7,4) προστίθενται 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  143 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος NADPH 3 mM, 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος DTNB 10 mM, 189  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 10  $\mu\text{L}$  κυτταροπλασματικού αιωρήματος που έχει επωαστεί με το 2-vinyl-pyridine. Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστίθενται 1  $\mu\text{L}$  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. Ο προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης στα δείγματα υπολογίζεται μέσω πρότυπου δειγμάτων που περιέχουν 75  $\mu\text{L}$  διαλύματος οξειδωμένης γλουταθειόνης 10  $\mu\text{mol/L}$ .

Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο δείγμα εκφράζεται ως nmol της GSSG ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >2-4 $\mu\text{g}$  απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Ως δείκτης εκτίμησης οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκε και ο λόγος GSH/GSSG. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol GSSG/ mg πρωτεΐνης} = \{[(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 0,75] / (A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \times 100\} / C_{\delta}$$

$A_{\text{sample}}$ : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

$A_{\text{blank}}$ : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

$A_{\text{standard}}$ : Η μέση τιμή της 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 αραίωσης 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 GSH  $\rightarrow$  1 GSSG)

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

### 2.2.2.β.vii. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004).

Πιο αναλυτικά, 200  $\mu$ L 20% TCA προστίθενται σε 200  $\mu$ L κυτταροπλασματικού αιωρήματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), 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  $\mu$ L DNP<sub>H</sub> 10 mM (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 500  $\mu$ L 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 DNP<sub>H</sub>. 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.

$\epsilon_{375}$ DNP<sub>H</sub> (nmol/mL): 0.022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNP<sub>H</sub>

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

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

### 2.2.2.β.viii. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έγινε με βάση την μέθοδο των Janaszewska και Bartosz (2002).

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονται 50 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος, 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4, 10 mM) και 500 μl διαλύματος ρίζας DPPH<sup>•</sup> 0,1 mM (50 μM 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. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο τη ρίζα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) αποτελούν το μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας αντιοξειδωτικής δράσης αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν 50 μM ασκορβικού οξέος, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) και 500 μL διαλύματος 0,1 mM ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

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

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

A<sub>blank</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A<sub>sample</sub>: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Τιμή 0,05: Η συγκέντρωση μmol /ml ρίζας DPPH<sup>•</sup> στην αντίδραση.

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος (V<sub>τελ.αντίδρασης</sub>/ μl αιωρήματος [1000 μl /20 μl]).

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

### **2.2.2.ix. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford**

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

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H<sub>2</sub>O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

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

### **2.2.3. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social

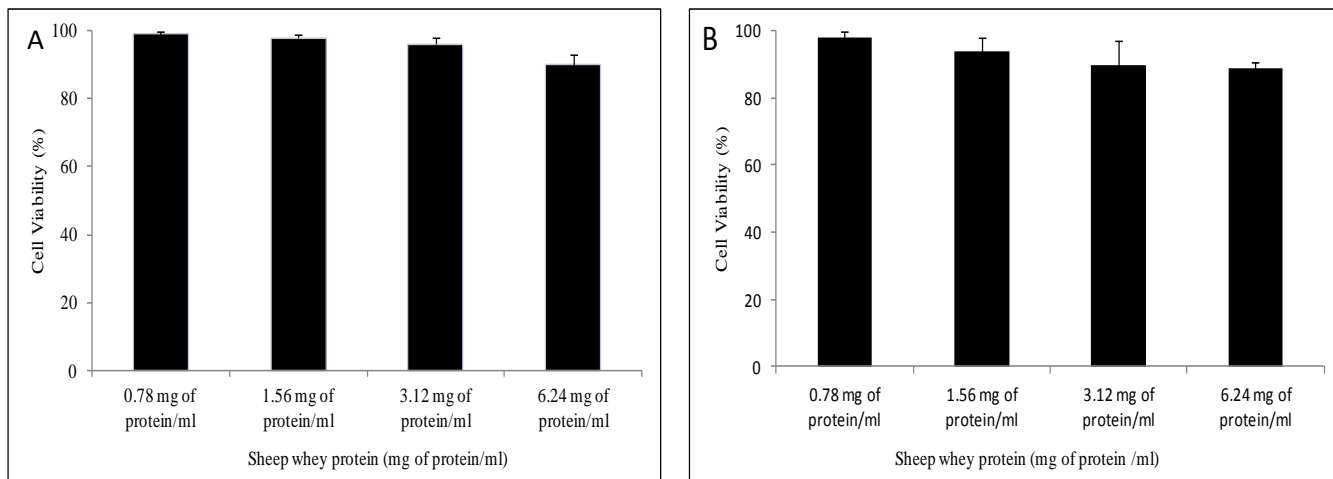
Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

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 mean  $\pm$  SEM.

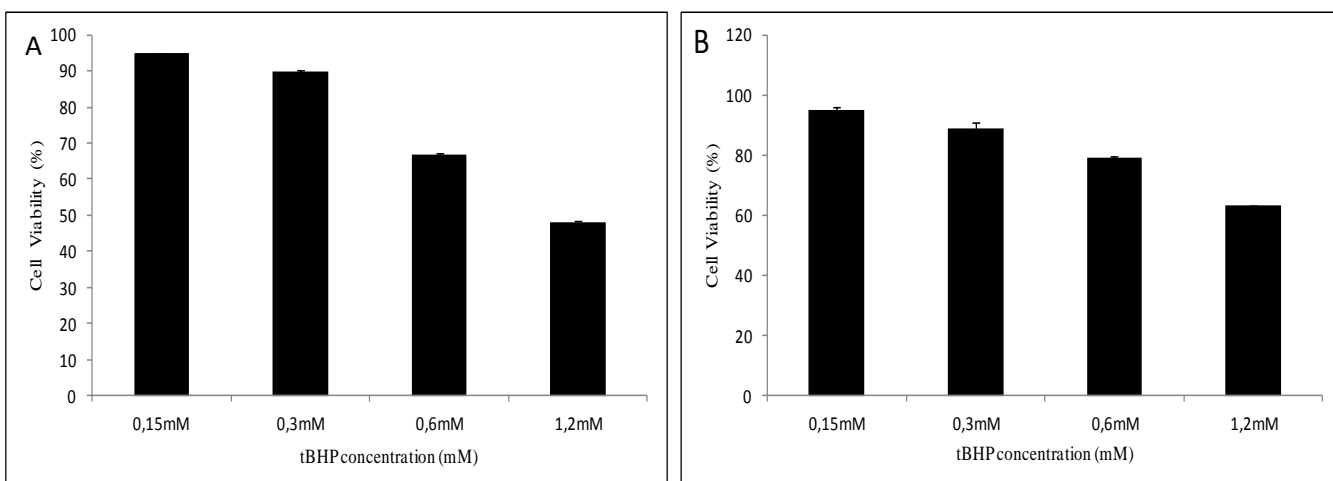
#### **2.2.4. Αποτελέσματα**

##### **2.2.4.a. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο XTT**

Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στα μυϊκά κύτταρα C2C12 (Γράφημα 3A) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 (Γράφημα 3B) στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (0.78, 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml). Ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP στη συγκέντρωση των 0.3 mM δεν προκαλούσε κυτταροτοξική δράση τόσο στα μυϊκά (C2C12) όσο και στα ενδοθηλιακά (EA.hy926) κύτταρα και ήταν και η συγκέντρωση που οδηγούσε στην επιθυμητή επαγωγή οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφάνισε κυτταροτοξική δράση (Γράφημα 4A,4B).



**Γράφημα 3:** Επιδράσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στη ζωτικότητα των (Α) μυϊκών κυττάρων C2C12 και των (Β) ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 4:** Επιδράσεις του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλο υδροϋπεροξειδίου (tBHP) στη ζωτικότητα των (Α) μυϊκών κυττάρων C2C12 και των (Β) ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



#### **2.2.4.β. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής**

Τα επίπεδα της GSH προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής mercury orange.

Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο Γράφημα 5A,B για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στο Γράφημα 6A,B για τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control (Γράφημα 7A, 8A). Τα επίπεδα της GSH στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, μειώθηκαν σημαντικά κατά 31.5% και 28.6% αντίστοιχα σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα της GSH στα μυϊκά κύτταρα C2C12 αυξήθηκαν κατά 25.7%, 112.9%, 118% and 138% και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 56.2%, 82.6%, 141% και 95.5% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml. Στο Γράφημα 7B για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στο Γράφημα 8B για τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της GSH στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml). Όπως παρατηρείται, επειδή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχουμε αυξημένα επίπεδα GSH έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά.

#### **2.2.4.γ. Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής**

Τα επίπεδα των ROS προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής DCF-DA.

Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο Γράφημα 9A,B για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στο Γράφημα 10A,B για τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Η μέση ένταση φθορισμού

επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control (Γράφηματα 11A, 12A). Τα επίπεδα των ROS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, δεν επηρεάστηκαν σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα των ROS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 12.8%, 16.4% και 41.3% για τις συγκεντρώσεις 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα, και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 32.6, 57.8, 58.5 και 24.4% σε σχέση με τα επίπεδα των ROS στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Στο Γράφημα 11B για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στο Γράφημα 12B για τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml). Όπως παρατηρείται, επειδή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχουμε μειωμένα επίπεδα ROS, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα αριστερά.

#### **2.2.4.δ. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS**

Τα επίπεδα των TBARS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, αυξήθηκαν σημαντικά κατά 29% και 19% αντίστοιχα σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα των TBARS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μειώθηκαν κατά 21.7%, 15%, 25.5% και 24% (Γράφημα 13A) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 38.7%, 39.4%, 48% και 52.5% (Γράφημα 14A) σε σχέση με τα επίπεδα των TBARS στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml.

#### **2.2.4.ε. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG**

Τα επίπεδα της GSSG στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, αυξήθηκαν κατά 11% σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα της GSSG στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 22%, 30% 31% για τις συγκεντρώσεις 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα (Γράφημα 13B), και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 40.5%, 46.7%, 28.1% και 32.5% (Γράφημα 14B) σε σχέση με τα επίπεδα της GSSG στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

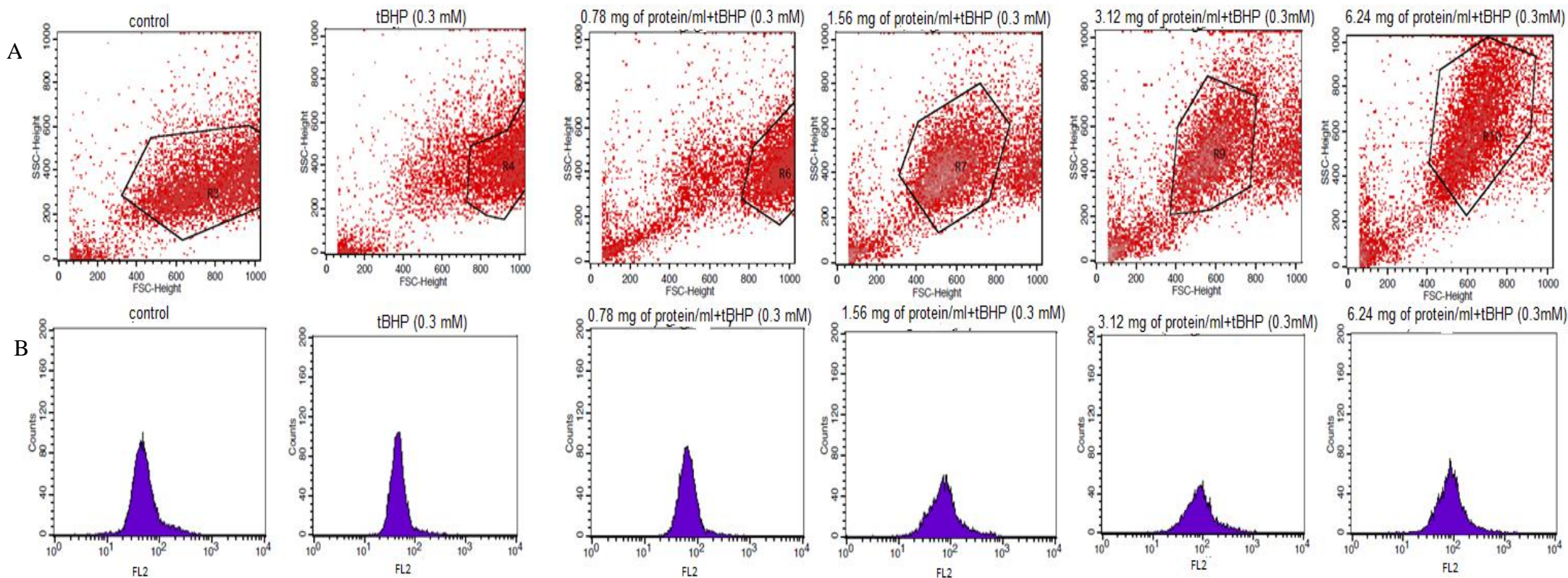
#### **2.2.4.στ. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, αυξήθηκαν σημαντικά κατά 45.7% και 60% αντίστοιχα σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 36%, και 51% για τις συγκεντρώσεις 1.56 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα (Γράφημα 13C), και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 22% και 49% (Γράφημα 14C) σε σχέση με τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.

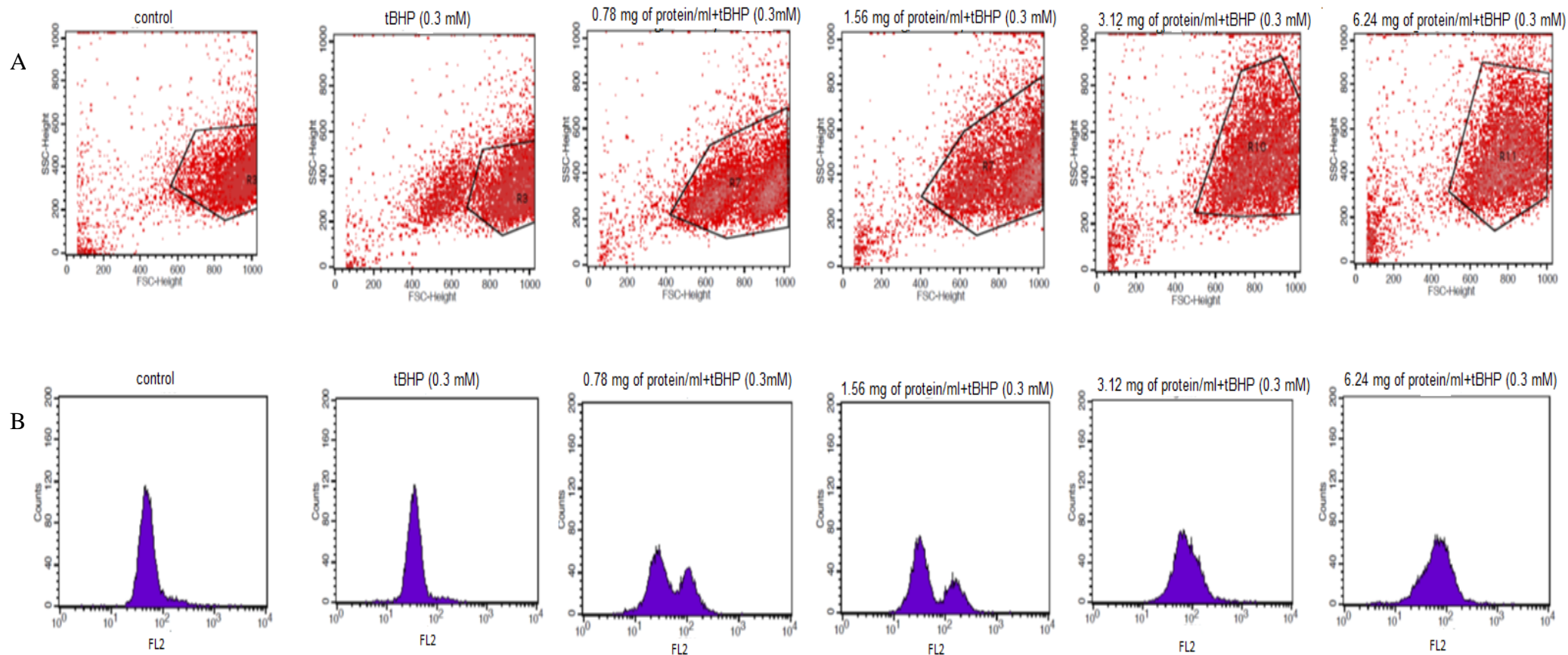
#### **2.2.4.ζ. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)**

Τα επίπεδα της TAC στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, μειώθηκαν κατά 27.7% και 19.45% αντίστοιχα σε σχέση με το control. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα της TAC στα μυϊκά κύτταρα C2C12

αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 37% και 37.5% αντίστοιχα (Γράφημα 13D), και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 34.2%, 49.7% και 52.45% (Γράφημα 14D) σε σχέση με τα επίπεδα της TAC στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BHP, για τις συγκεντρώσεις 1.56, 3.12 και 6.24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα.



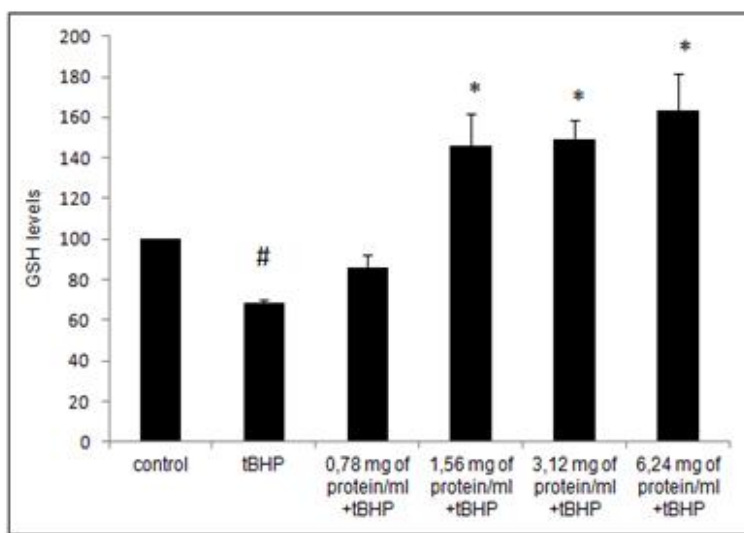
**Γράφημα 5:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH). (A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 30 min.



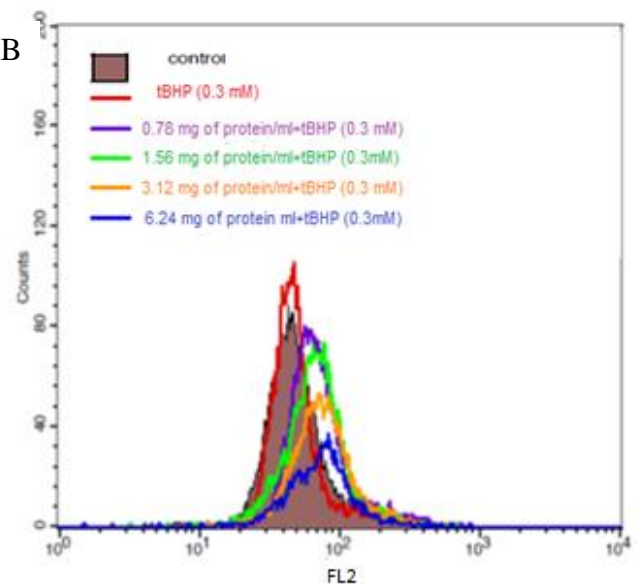
**Γράφημα 6:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH). (A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 1 h.



A

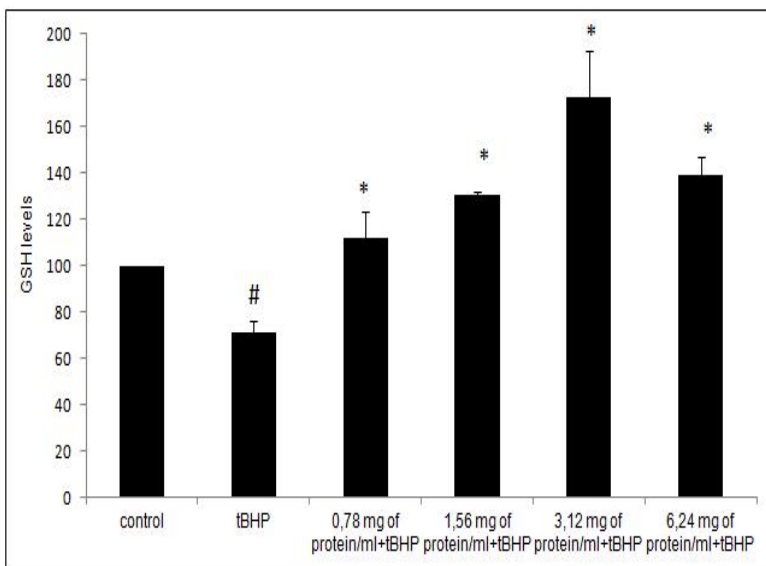


B

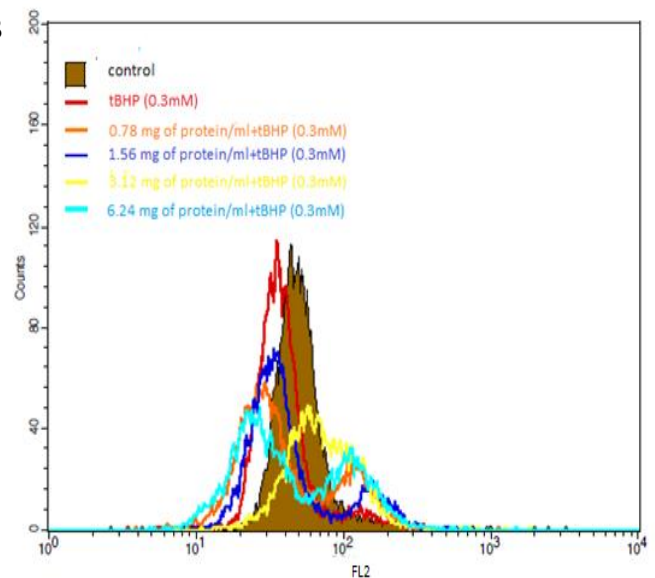


**Γράφημα 7:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) των μυϊκών κυττάρων C2C12 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της GSH από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B). Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

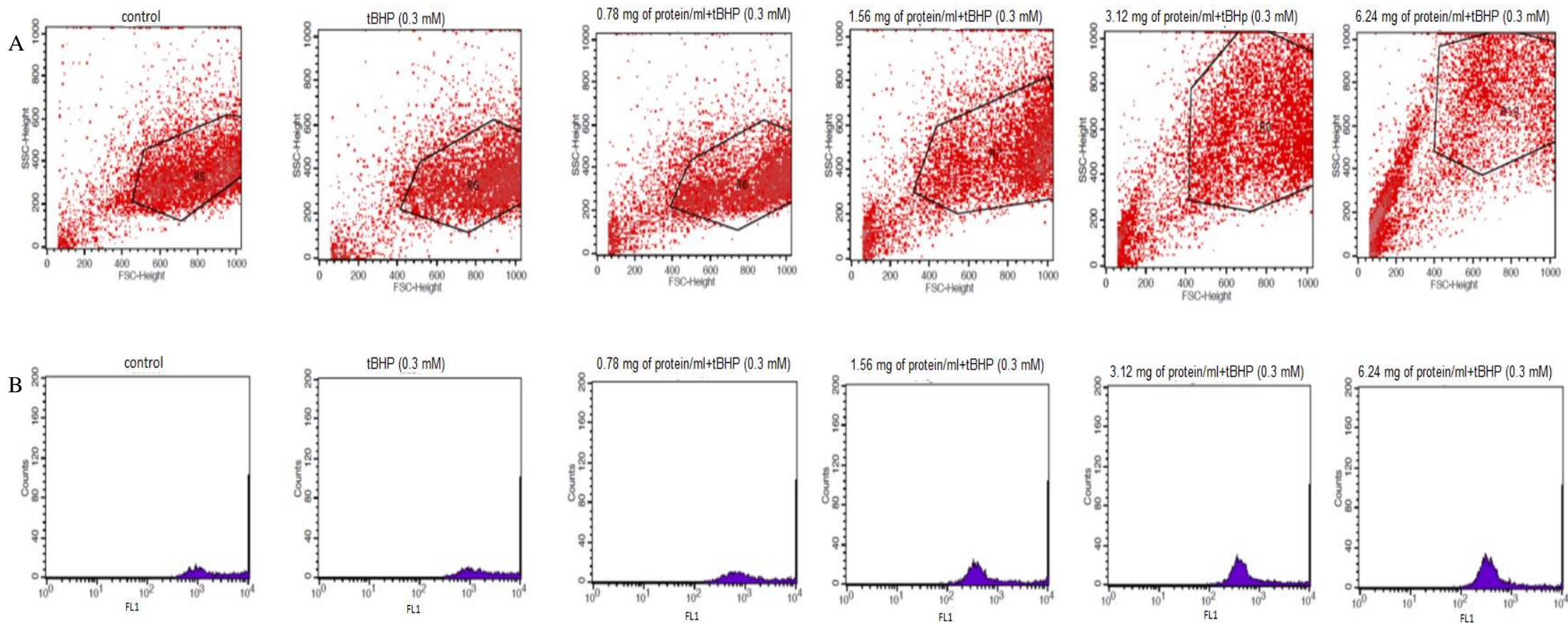
A



B

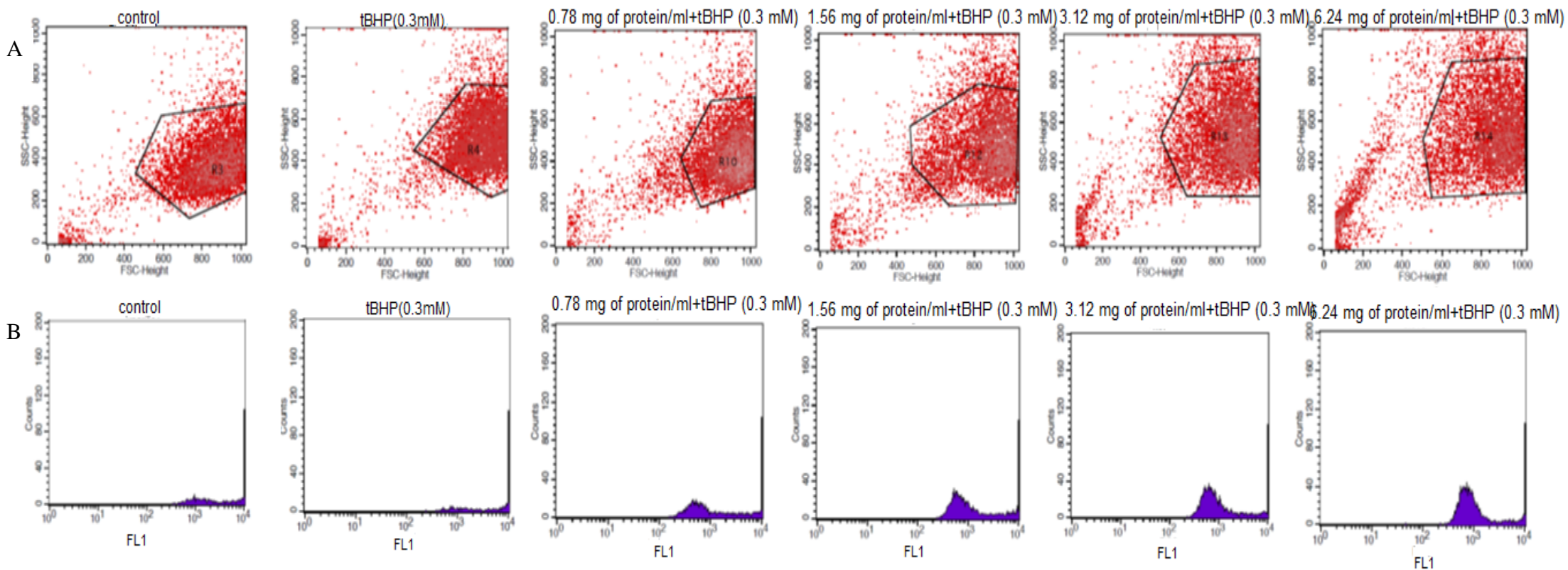


**Γράφημα 8:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της GSH από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B). Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 1 h. # Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

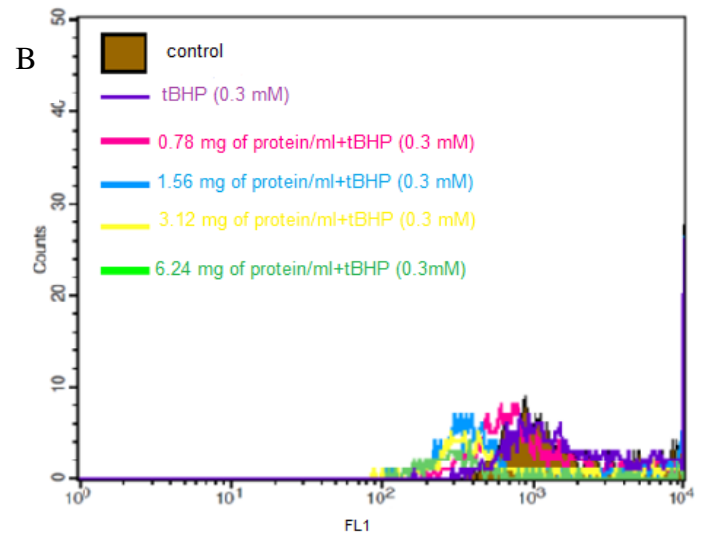
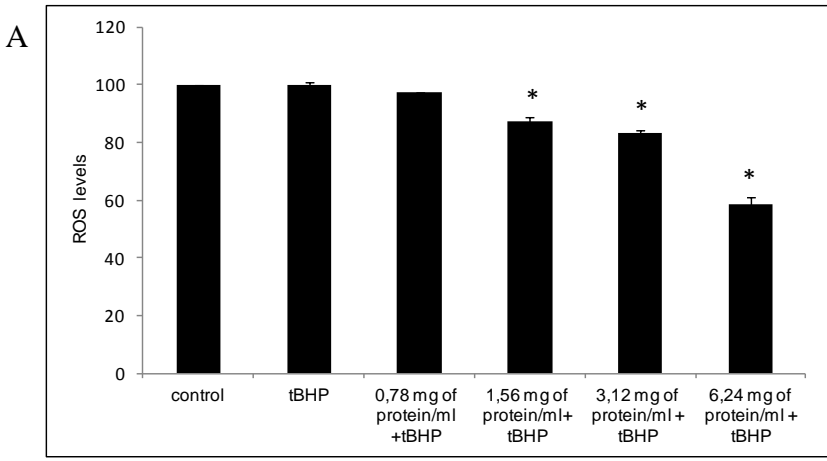


**Γράφημα 9:** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS). (A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 30 min.

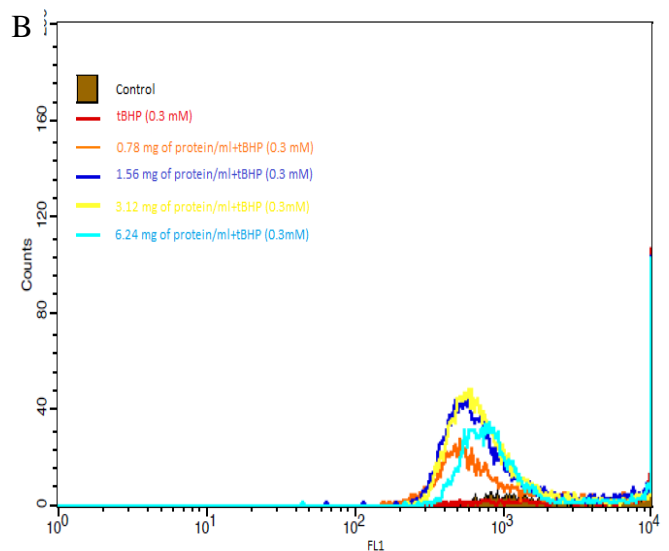
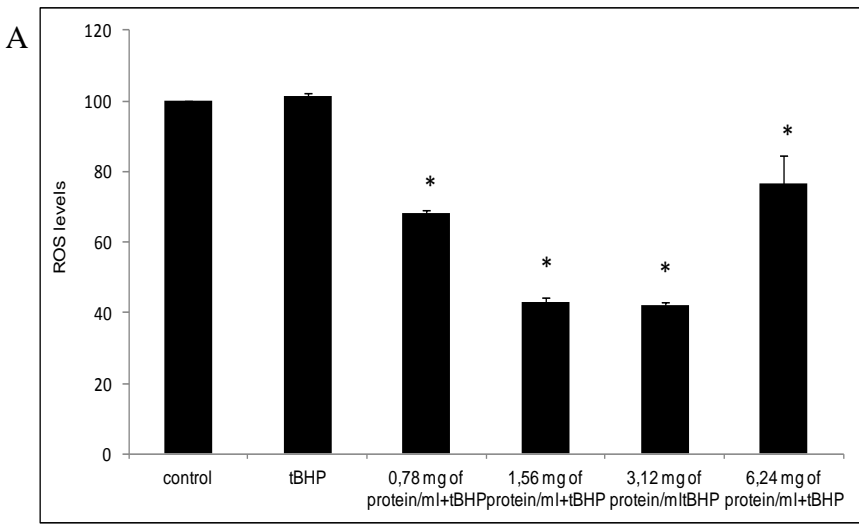




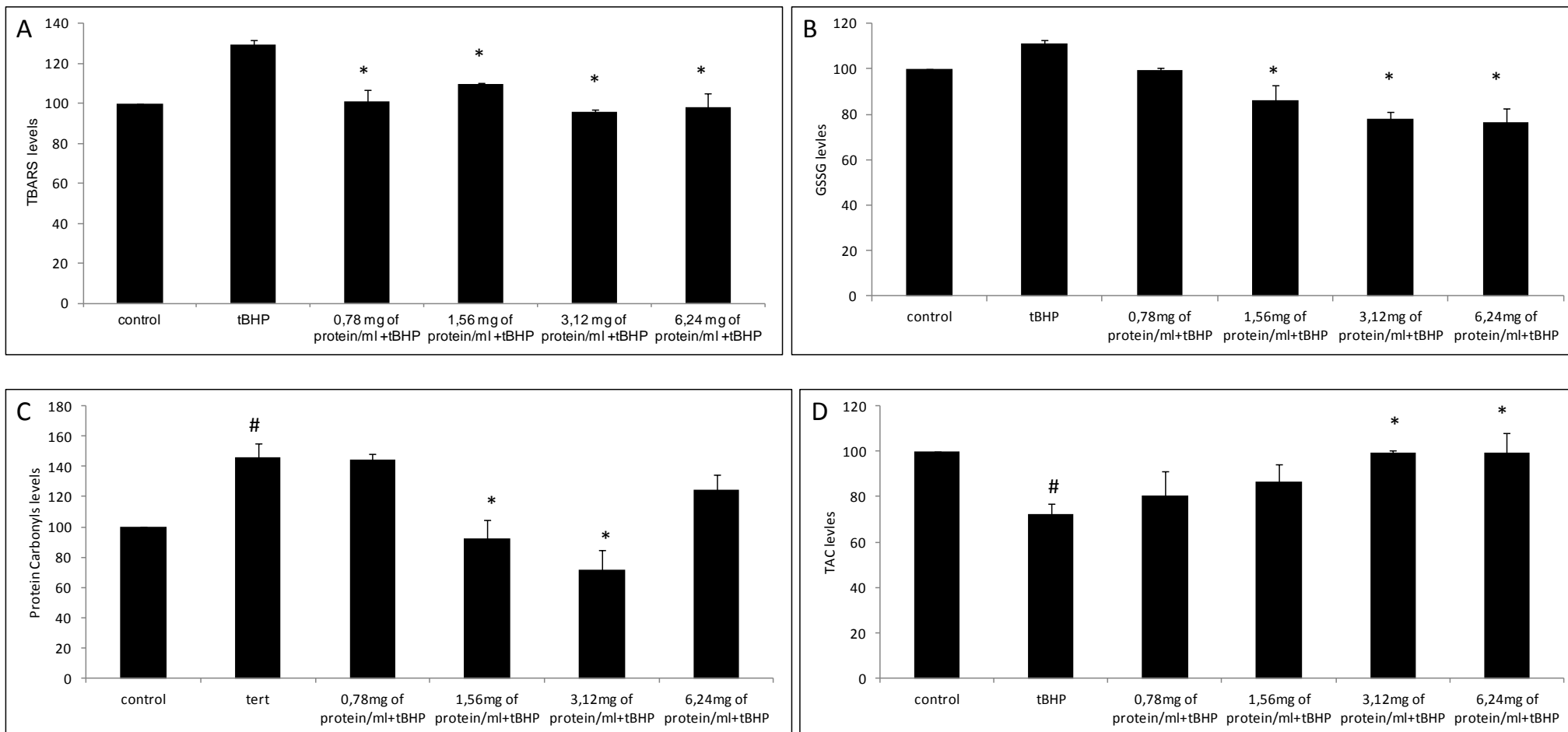
**Γράφημα 10:** Ανάλυση κυτταρομετρία ροής στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS). (A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 1 h.



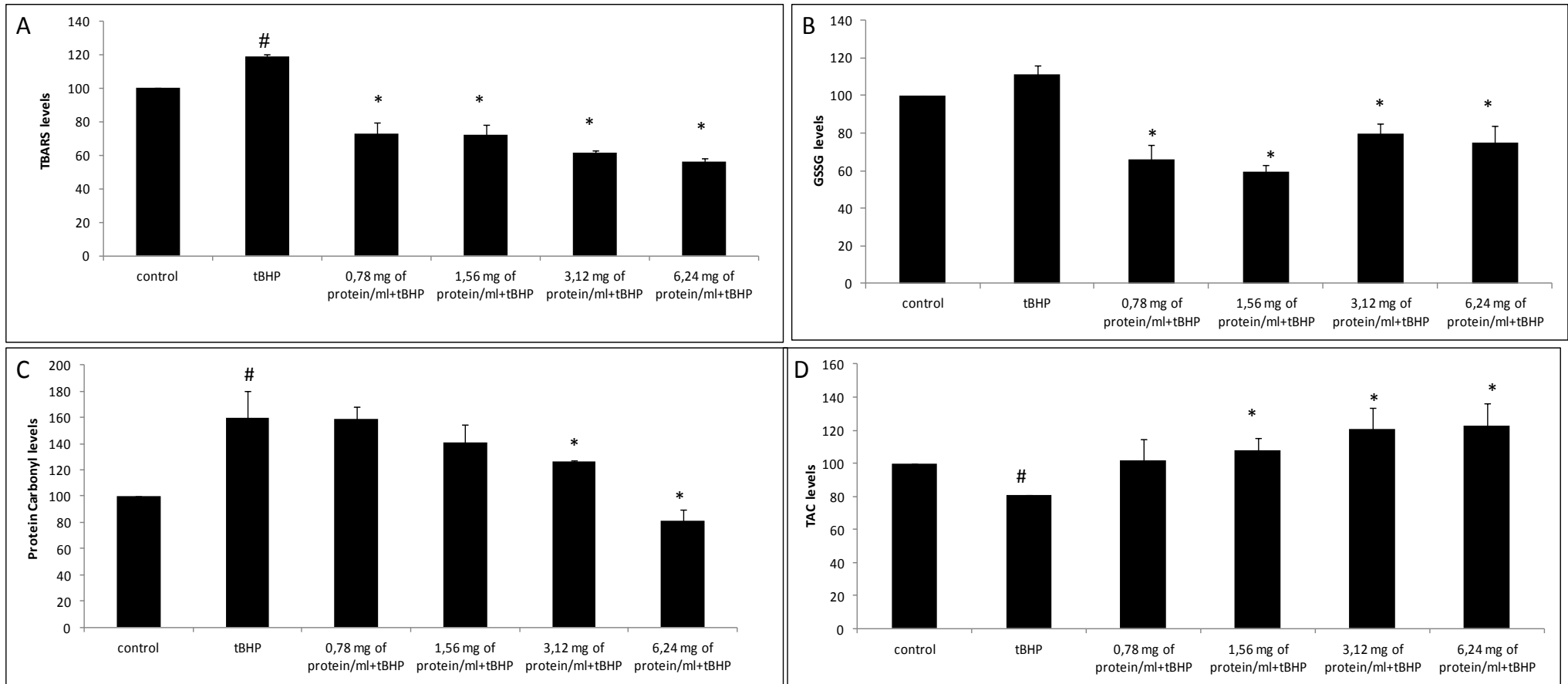
**Γράφημα 11:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των μυϊκών κυττάρων C2C12 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ROS από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B). Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 30 min. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 12:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 (A). Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ROS από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής (B). Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP (0.3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 1 h. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 13:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα (A) των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), (B) της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), (C) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και (D) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των μυϊκών κυττάρων C2C12. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP(0.3 mM) για 30 min και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 14:** Επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα (A) των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), (B) της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), (C) των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και (D) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από τρεις διαφορετικές καταστάσεις: υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP(0.3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78-6.24 mg of protein/ml) και του tBHP (0.3 mM) για 1 h. # Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την κατάσταση χορήγησης μόνο του tBHP ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

### 2.2.5. Συζήτηση

Η ανισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών μορίων και των αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί λιπιδική υπεροξειδωση, πρωτεϊνική οξείδωση και βλάβη στο DNA. Το οξειδωτικό στρες επίσης συνδέεται με πολλές ασθένειες (Valko et al., 2007). 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 ενίσχυση του οργανισμού με αντιοξειδωτικά μέσω της διατροφής παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι στο προκαλούμενο από τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP οξειδωτικό στρες στην μυϊκή κυτταρική σειρά C2C12 και στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926.

Η GSH, η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγήθειόλης στα κύτταρα, είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Είναι παρούσα σε συγκεντρώσεις της τάξης των micromolar ( $\mu\text{M}$ ) στα σωματικά υγρά και της τάξης των millimolar ( $\text{mM}$ ) στους ιστούς (Owen & Butterfield, 2010). Ένα μεγάλο ποσοστό της ενδοκυτταρικής GSH (85-90%) είναι παρόν στο κυτοσόλιο (Lu, 2000) ενώ ένα ποσοστό περίπου 20% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια όπου βοηθάει στην προστασία από τα ROS που παράγονται ως υποπροϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Livingstone & Davis, 2007). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα, στον μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών και κυτταρικών γεγονότων (Wu et al., 2004). Η GSH ασκεί τη δράση της με το να δίνει ένα άτομο υδρογόνου σε έναν μεγάλο αριθμό ριζών (Yu, 1994), χρησιμεύοντας ως υπόστρωμα για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ( $\text{GP}_x$ ) (Meister & Anderson, 1983) και ανάγοντας άλλα αντιοξειδωτικά στο κύτταρο όπως η βιταμίνη E (Reddy et al., 1982). Λόγω των καταλοίπων κυστεΐνης, η GSH οξειδώνεται μη ενζυμικά σε GSSG από ηλεκτρόφιλες ουσίες (π.χ. ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου). Η εκροή GSSG από το κύτταρο συμβάλλει στην απώλεια της ενδοκυτταρικής GSH (Wu et al., 2004). Τα επίπεδα της GSH μειώνονται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Lu, 2000). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα της GSH μετά την επώαση μόνο με τον οξειδωτικό παράγοντα μειώθηκαν στα μυϊκά κύτταρα C2C12 κατά 31.5% και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 κατά 28.6% ενώ τα επίπεδα της GSSG αυξήθηκαν κατά 11% και στις δύο κυτταρικές σειρές. Έχει αναφερθεί ότι ο παράγοντας tBHP

οξειδώνει την GSH μέσω της δράσης της GP<sub>x</sub> και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα GSSG (Lima et al., 2006). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια προστέθηκε ο tBHP τότε η πρωτεΐνη φάνηκε ότι εμφανίζει προστατευτική δράση καθώς τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν έως 138% στα C2C12 κύτταρα και έως 141% στα EA.hy926 κύτταρα ενώ τα επίπεδα της GSSG μειώθηκαν έως 31% στα C2C12 κύτταρα και έως 46.7% στα EA.hy926. Τα αποτελέσματα μας είναι σύμφωνα με αυτά προηγούμενων μελετών. Συγκεκριμένα, οι Xu et al. (2011) έδειξαν ότι η χορήγηση 0.5 mg/ml πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε μυϊκά κύτταρα C2C12, υπό την επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 341% σε σχέση με τη χορήγηση μόνο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση 0.1, 1 και 10 mg/ml πρωτεΐνης ορού γάλακτος, πριν από την έκθεση σε αιθανόλη, στην κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυτώματος (PC12) αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 20%, 43% και 98% αντίστοιχα (Tseng et al., 2006). Σε μια μελέτη των Keefe & FitzGerald (2014) επώαση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιας φλέβας (HUVECs) με υδρολυμένα κλάσματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος οδήγησε σε αύξηση της κυτταρικής GSH. Η επίδραση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της GSH σχετίζεται με το υψηλό περιεχόμενο της σε κυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα της GSH και καθορίζει το ρυθμό βιοσύνθεσης της GSH (Lu, 1999). Υπάρχει ανταγωνισμός για τη χρήση της κυστεΐνης είτε για παραγωγή GSH είτε για πρωτεϊνική σύνθεση, με τη δεύτερη να ευνοείται όταν τα επίπεδα των αμινοξέων στο κύτταρο είναι χαμηλά. Επομένως, μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη, όπως η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, λαμβάνεται μέσω διατροφής τότε η βιοσύνθεση της GSH επάγεται.

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσής). Η χορήγηση του tBHP οδήγησε σε σημαντική αύξηση των TBARS κατά 29% στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και κατά 19% στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP αντιδρά με τον Fe<sup>2+</sup> οδηγώντας σε σχηματισμό ριζών τριτ-βούτυλ-υδροπεροξυλίου (tBO<sup>•</sup>) (Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες tBO<sup>•</sup> όσο και η αλληλεπίδραση του tBHP με την GSH έχουν συσχετιστεί με τη λιπιδική υπεροξειδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006). Η χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος, οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των TBARS έως 25.5% στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και έως 52.5% στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Επιπλέον, οι Xu et al. (2011) έδειξαν ότι στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε συγκέντρωση 0.5 mg/ml ανέστειλε τα αυξημένα επίπεδα MDA, έναν δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσής.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν δείκτη πρωτεϊνικής οξειδωσης. 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 και των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 με τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 45.7% και 60% αντίστοιχα. Τα παραπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν σε πρωτεϊνική οξειδωση (Kim et al., 1997; Requena et al., 1997). Όπως αναφέραμε παραπάνω, ο tBHP οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των TBARS τόσο στα μυϊκά όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ακόμη, ο tBHP οδηγεί σε παραγωγή των ριζών tBO<sup>•</sup> (Hix et al., 2000), οι οποίες είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε οξειδωση των πρωτεϊνών, είτε απευθείας από την επίθεση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων είτε έμμεσα οδηγώντας σε λιπιδική υπεροξειδωση. Η χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος, οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έως 51% στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και έως 49% στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

Όσον αφορά την TAC, ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της στα C2C12 κύτταρα και στα EA.hy926 κατά 27.7% και 19.45%. Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος και στη συνέχεια χορηγήθηκε ο παράγοντας tBHP, τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν σημαντικά έως και 37.5% στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και έως 52.45% στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τέλος, τα επίπεδα των ROS δεν επηρεάστηκαν από την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα tBHP. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου (π.χ. GSH) και/ή από την αντίδραση τους με άλλα μόρια. Έτσι, αν και ο tBHP παράγει ελεύθερες ρίζες, η “ελεύθερη μορφή” τους δεν μπορεί να παρατηρηθεί. Για παράδειγμα, παρατηρήσαμε μία μείωση στα επίπεδα της GSH και μια αύξηση στη λιπιδική υπεροξειδωση και την πρωτεϊνική οξειδωση μετά τη χορήγηση του tBHP, κάτι που υποδεικνύει ότι οι ελεύθερες ρίζες αντέδρασαν με την GSH, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Η χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των ROS έως 41.3% στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και έως 58.5% στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα είναι και μία άλλη μελέτη όπου το απομόνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (pWPI) και προϊόντα υδρόλυσης της πρωτεΐνης ορού γάλακτος (nWPI) στη συγκέντρωση των 2 mg/ml

ανέστειλαν τον επαγόμενο από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχηματισμό ROS κατά 76% και 32.5% αντίστοιχα στην ανθρώπινη καρκινική σειρά του παχέως εντέρου (Caco-2) (Piccolomini et al., 2012).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν μια εξήγηση για τους κυτταρικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων δείχνουν ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να ασκήσει προστατευτική δράση κατά του οξειδωτικού στρες σε μυϊκά κύτταρα και σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της TAC και μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, της πρωτεϊνικής οξειδωσης και των ROS. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκείται αυτή η προστατευτική δράση είναι η αύξηση των επιπέδων της GSH.

### **2.3. Προσδιορισμός της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στον μεταγραφικό παράγοντα Nuclear factor (erythroid-derived 2) (Nrf2) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926**

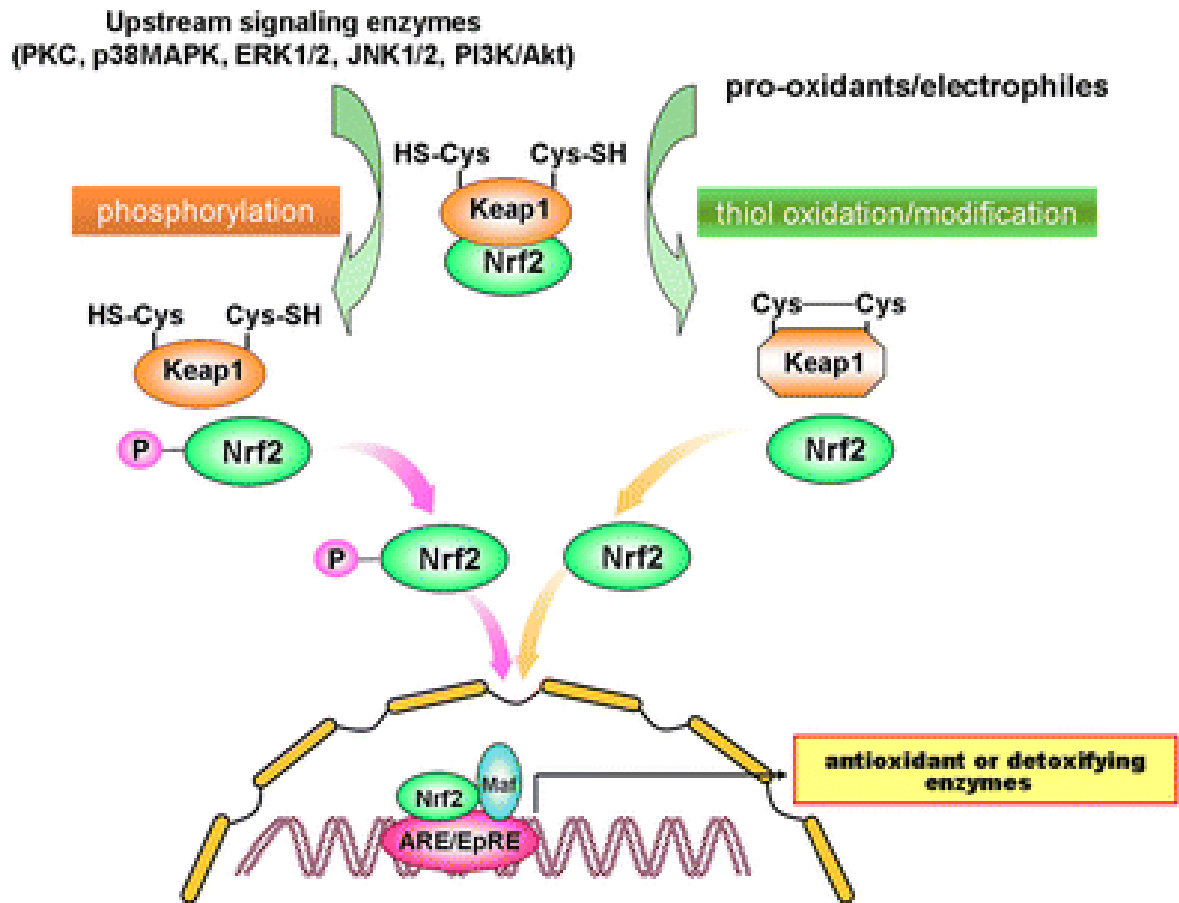
#### **2.3.1. Γενικά**

Το οξειδωτικό στρες επάγεται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως ξενοβιοτικά, φάρμακα, βαρέα μέταλλα και ιονίζουσα ακτινοβολία. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην παραγωγή ROS και ηλεκτρονιόφιλων. Όταν η παραγωγή ROS είναι μεγαλύτερη από την κυτταρική ικανότητα αποτοξίνωσης, μπορεί να διεγείρει αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να καταστρέψουν κυτταρικά βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και τελικά να οδηγήσουν σε ασθένειες (Breimer, 1990; Meneghini, 1997). Οι ROS έχουν εμπλακεί σε περισσότερες από 100 ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης και η διαταραχή της επαναιμάτωσης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Επομένως, τα κύτταρα πρέπει συνεχώς να ελέγχουν τα επίπεδα των ROS και να προλαμβάνουν τη συσσώρευση τους. Έχοντας εξελιχθεί σε περιβάλλον οξυγόνου, τα περισσότερα κύτταρα έχουν αποκτήσει περίπλοκους μηχανισμούς για να αντιμετωπίσουν την επαγόμενη από ROS τοξικότητα. Μια από τις πιο κύριες κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις είναι η επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω του κυτταροπλασματικού συστήματος οξειδωτικού στρες (Nrf2-Kear1), το οποίο ενεργοποιείται από μια ποικιλία φυσικών και συνθετικών παραγόντων προφύλαξης (Nguyen et al., 2003). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η Kear1 εδραιώνει τον



μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας τον προς ουβικουτινίωση και πρωτεοσωμική αποικοδόμηση, για να διατηρήσει χαμηλά τα επίπεδα του Nrf2. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παράγοντες προφύλαξης και οξειδωτικό στρες, ένα σήμα που μπορεί να περιλαμβάνει φωσφορυλίωση και/ή οξειδοαναγωγική τροποποίηση του καταλοΐπου κυστεΐνης της Keap1, αναστέλλει την ενζυμική δράση του συμπλέγματος Keap1-CuI3-Rbx1 E3 λιγάση ουβικουτίνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ουβικουτινίωση και αποικοδόμηση του Nrf2. Σαν αποτέλεσμα, ο ελεύθερος Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα και σε συνδυασμό με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. sMaf, ATF4, JunD, PMF-1) ενεργοποιεί τα αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης (AREs) / ηλεκτρονιόφιλα στοιχεία απόκρισης (ErREs) πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, καθώς και του ίδιου του Nrf2 (Osburn & Kensler, 2008; Nguyen et al., 2003; Giudice & Montella, 2006; Kwak et al., 2003) (Εικόνα 24). Οι οικογένειες των ενζύμων τα οποία επάγονται έχουν ταξινομηθεί σε διάφορες κατηγορίες: (α) ξενοβιοτικά ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II [π.χ. τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSTs), UDP-γλυκουρονυλτρανσφεράση (UDPGTs), NAD(P)H:κινόνη οξειδορεδοκτάσης (NQO1), υδρολάση εποξειδίου (EH), αλδεϋδική ρεδοκτάση της αφλατοξίνης B1 (AFAR), οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1), φερριτίνη, (β) αντιοξειδωτικά ένζυμα [π.χ. συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (g-GCS), υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), αναγωγή της θειορεδοξίνης (TR)], (γ) μοριακοί συνοδοί/πρωτεοσωμικά συστήματα, (δ) ένζυμα επιδιόρθωσης DNA και (ε) αντι-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες (π.χ. HO-1, φερριτίνη) (Kwak et al., 2003; Hayes & McLellan, 1999; Talalay et al., 2003; Li et al., 2002; Kelly et al., 2000).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 2.2), η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος άσκησε προστατευτική δράση σε μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 από το οξειδωτικό στρες. Έτσι, στην παρούσα μελέτη για να διερευνήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων δρα η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος εξετάσαμε την επίδραση της στον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 καθώς και στην πρωτεϊνική έκφραση και δράση ενός αριθμού ενζύμων ( SOD-1, HO-1, CAT, GCS, GST) που επάγονται από αυτόν τον παράγοντα στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.



**Εικόνα 24:** Μονοπάτια μεταγωγής σήματος υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE. Η ενεργοποίηση του Nrf2 ρυθμίζεται από δύο σηματοδοτικά μονοπάτια. Κατά τη διέγερση των κυττάρων, η ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών όπως η PI3K, η PKC, η JNK, η p38MAPK και η ERK επάγει τη φωσφορυλίωση του Nrf2, το οποίο διευκολύνει το διαχωρισμό του από τον καταστολέα Keap1 και την επακόλουθη μετατόπιση του στον πυρήνα και την αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή CBP/p300. Εναλλακτικά, τα προοξειδωτικά ή τα ηλεκτρόφιλα αλληλεπιδρούν άμεσα με το κατάλοιπο κυστεΐνης της Keap1 και διεγείρουν την αποδέσμευση του Nrf2. Και τα δύο γεγονότα μπορούν να διευκολύνουν την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται με μικρές πρωτεΐνες Maf, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές που προσδένεται στο αντιοξειδωτικό στοιχείο απόκρισης (ARE) ή στο ηλεκτρονιόφιλο στοιχείο απόκρισης (EpRE) και διεγείρει τη μεταγραφή ενζύμων μεταβολισμού φάσης II ή αντιοξειδωτικών ενζύμων.

### 2.3.2. Υλικά και Μέθοδοι

#### 2.3.2.α. Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (Grand Island, NY). Τα χημικά αντιδραστήρια 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ], HEPES], NP-40, διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT), αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), Triton X-100, χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl), γλυκίνη (glycine), δωδέκυλο θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS), υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate), τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (tetramethylethylenediamine, EDTA), διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (diethylenetriaminopentaacetic acid, DETAPAC), ξανθίνη (xanthine), 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB), νιτροκυανό του τετραζολίου (nitroblue tatrazolum, NBT), γλουταθειόνη (GSH), δεοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate), το διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v), τα ένζυμα καταλάση (catalase) και οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Τα αντισώματα anti-Nrf2, anti-PCNA, anti-rabbit, anti-goat, anti-GAPDH αποκτήθηκαν από την εταιρία Thermo Scientific. Τα αντισώματα anti-SOD1, anti-GCS αποκτήθηκαν από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology και τα αντισώματα anti-HO-1 και anti-CAT αποκτήθηκαν από την εταιρία R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).

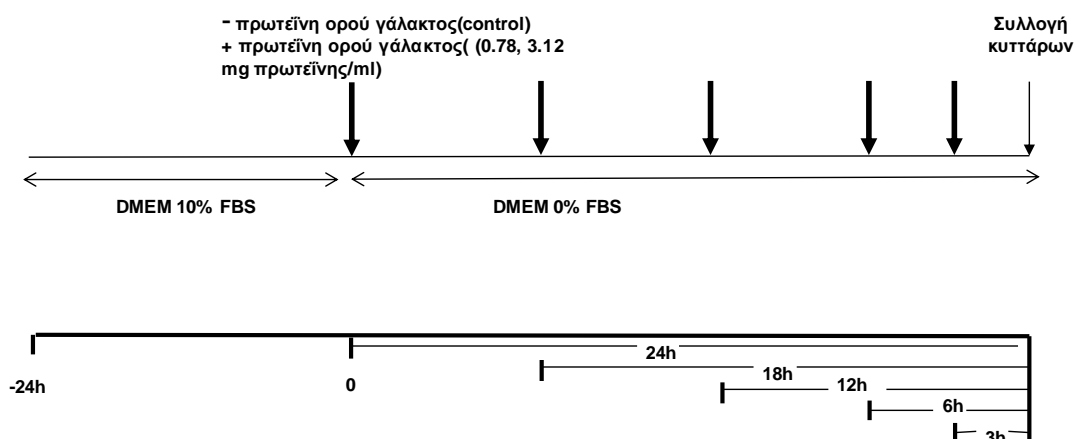
#### 2.3.2.β. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926

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

στους 37°C και ακολουθούσε επαναίωση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

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

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 25. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργούνται σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται, αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS και προστίθεται η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 mg πρωτεΐνης/ml και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) (1 ml) και ακολουθεί επώαση για διάφορες χρονικές στιγμές (24h, 18h, 12h, 6h, 3h). Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Μετά την προσθήκη πρωτεΐνης ακολουθεί επώαση για 24 h. Μετά το τέλος της επώασης, ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (1ml) (0.25%), επαναίωση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:1 (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται στο κατάλληλο ρυθμιστικό λυτικό διάλυμα (lysis buffer).



**Εικόνα 25:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2, της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1), της καταλάσης (CAT), της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) και της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) και της ενζυμικής δράσης της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης(GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml). Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων. Τα μεγάλα βέλη συμβολίζουν τη χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

#### **2.3.2.δ. Προετοιμασία του ολικού κυτταρολύματος**

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

#### **2.3.2.ε. Προετοιμασία του κυτοσολικού και πυρηνικού κυτταρολύματος**

Τα κύτταρα λύνονται με 50-150 μl κυτοσολικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (cytosolic lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete™ mini protease inhibitors). Στη συνέχεια επωάζονται στον πάγο για 20 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16.250 g, στους 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο (κυτοσολικό κυτταρόλυμα) απομακρύνεται και το ίζημα λύεται ξανά με 50-100 μl πυρηνικού λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (nuclear lysis buffer, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% γλυκερόλη, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Complete™ mini protease inhibitors). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με υπερήχους για 30 sec σε περιοδικά

διαστήματα των 10 sec. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 16.250 g, στους 4°C για 15 min και το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το πυρηνικό κυτταρόλυμα. Στο κυτοσολικό και πυρηνικό κυτταρόλυμα έγινε προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

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

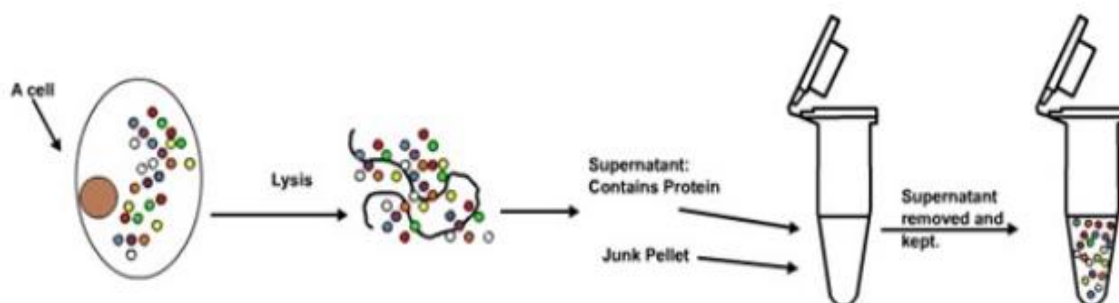
Η τεχνική Western blotting (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών βασιζόμενη στην ικανότητα τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Towbin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

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

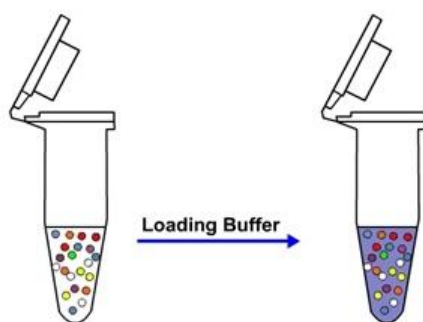
Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

#### Βήμα 1: Προετοιμασία δείγματος

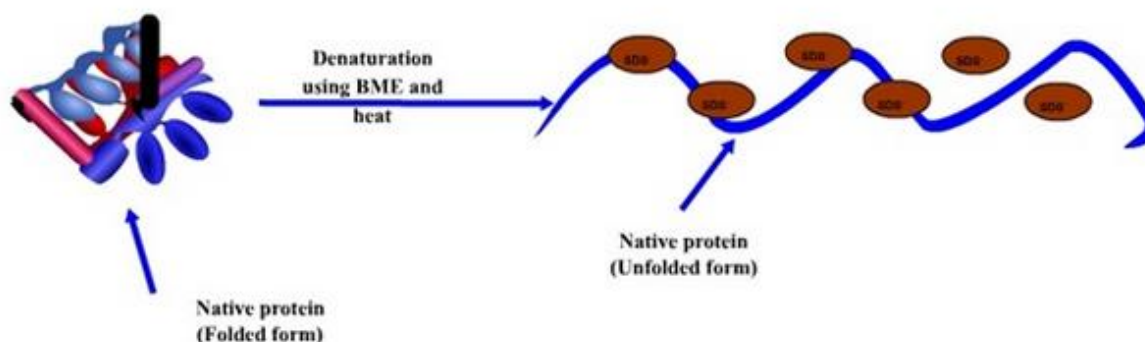
Το πρώτο βήμα στην προετοιμασία δείγματος είναι η απομόνωση της πρωτεΐνης από το δείγμα. Συνήθως οι πρωτεΐνες προέρχονται από κύτταρα.



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

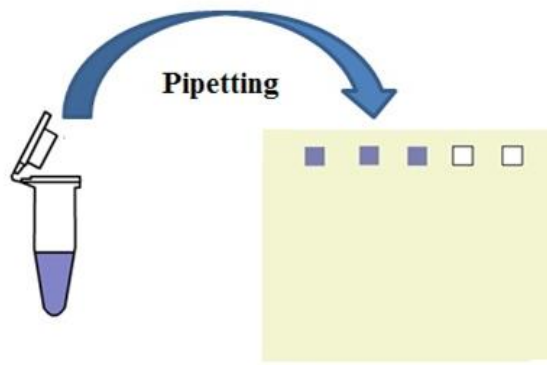


Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται και θερμαίνονται κοντά στο σημείο βρασμού, το οποίο μετουσιώνει την πρωτεΐνη και επιτρέπει την πρόσδεση του SDS στην πρωτεΐνη.

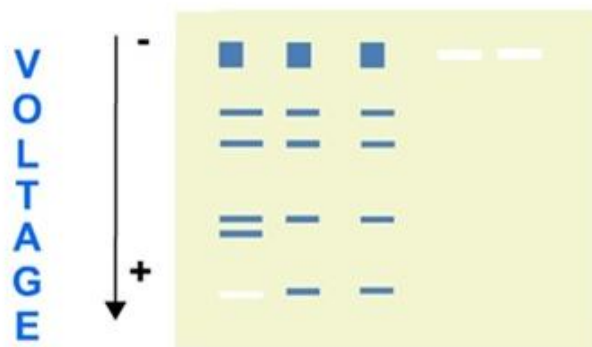


## Βήμα 2: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

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



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

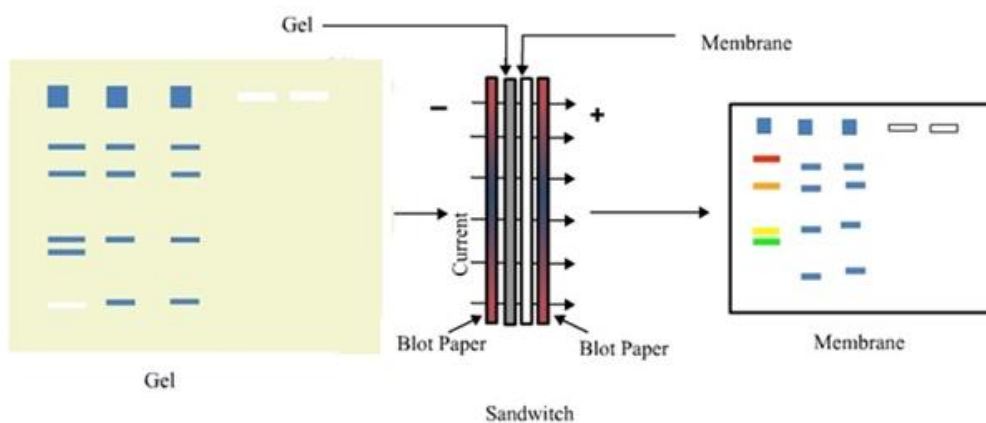


### Βήμα 3: Μεμβρανική μεταφορά

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται απέναντι σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Στη συνέχεια ρεύμα διέρχεται διαμέσου του

πι

μι



### Βήμα 4: Ανοσοαποτύπωση

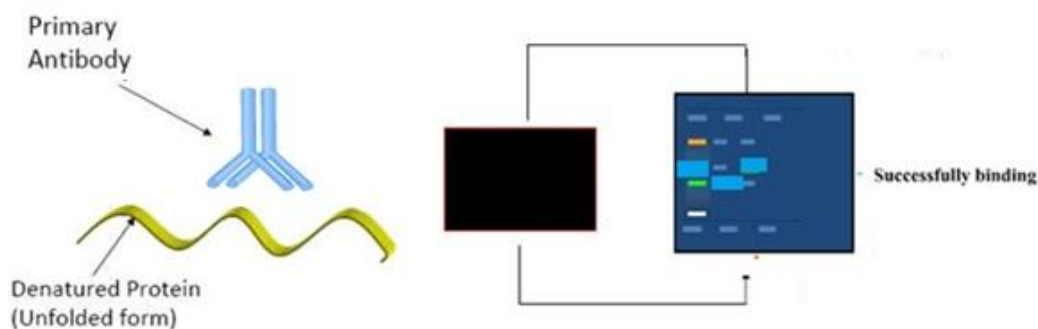
Το πρώτο βήμα στην ανοσοαποτύπωση είναι το πλύσιμο και μπλοκάρισμα της μεμβράνης με μια μη-ειδική πρωτεΐνη. Η μη-ειδική πρωτεΐνη προσδένεται στην



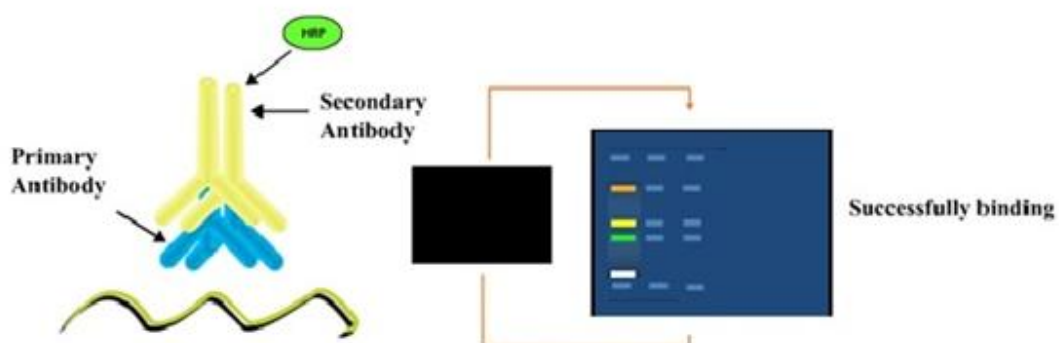
επιφάνεια της μεμβράνης όπου η πρωτεΐνη δεν είναι παρούσα και έτσι αποτρέπει την πρόσδεση του αντισώματος και την εμφάνιση μη-ειδικού σήματος.



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



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

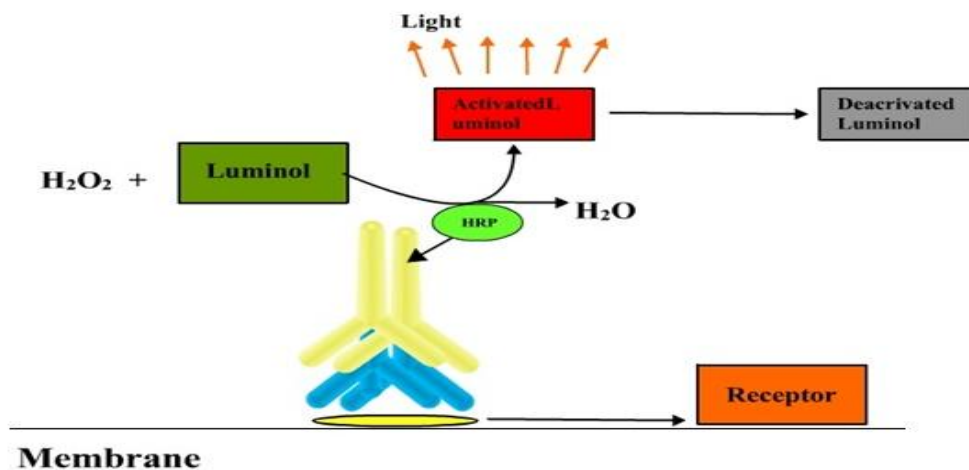


Τέλος, πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος. Μη-ειδική δέσμευση των πρωτογενών και των δευτερογενών αντισωμάτων μπορεί να συμβεί αλλά οι πλύσεις ελαχιστοποιούν αυτό το πρόβλημα. Ο

χρόνος επώασης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος επηρεάζει άμεσα την ειδικότητα και την ισχύ της δέσμευσης.

### Βήμα 5: Ανίχνευση

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



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



Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων του Nrf2, της SOD-1, της HO-1, της CAT και της GCS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Το ολικό κυτταρόλυμα που περιέχει 50  $\mu$ g πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της SOD-1, της HO-1 και της CAT, το κυτοσολικό κυτταρόλυμα που περιέχει 30-50  $\mu$ g πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του κυτοσολικού Nrf2 και της GCS και το πυρηνικό κυτταρόλυμα που περιέχει 30  $\mu$ g πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του πυρηνικού Nrf2. Στο πρωτεϊνικό κυτταρόλυμα προστίθεται 6 $\times$

Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα “φορτώνονται” και διαχωρίζονται σε 6-10% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτή πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 0.5 M pH 6.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 1.5 M pH 8.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτή ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Κλείνουμε την κασετίνα και τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4 °C overnight. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται για 1 h με τα πρωτογενή αντισώματα (anti-Nrf2, αραιώση 1:2000; anti-SOD-1, αραιώση 1:600; anti-GCS, αραιώση 1:600; anti-HO-1, αραιώση 1:400; anti-CAT, αραιώση 1:400) σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-rabbit, αραιώση 1:5000; anti-goat, αραιώση 1:3000) για 30 min σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 min της μεμβράνης με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για 1 min και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Η πρωτεΐνη GAPDH και η πρωτεΐνη PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά control. Το ποσό του

ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Alpha Innotech. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

### 2.3.2.ζ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT στα δείγματα έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984).

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

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

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

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

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

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

Τιμή 1000: Για την μετατροπή mol/l σε  $\mu$ mol/ml.

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

### 2.3.2.η. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD

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

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

Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(control \text{ rate} - sample \text{ rate}) / control \text{ rate}] \times 100 / C_s.$$

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

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

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

### 2.3.2.θ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST

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

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 7.4) με 50 μl GSH (1 mM) και 20 μl CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10 μl του κυτοσολικού κυτταρολύματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm για 5 min. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλυμα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα

εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.

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

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

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

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

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

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

### 2.3.3. 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 mean  $\pm$  SEM.

### 2.3.4.Αποτελέσματα

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

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των επαγόμενων από αυτόν ενζύμων, όπως η SOD-1, η HO-1, η CAT και η GCS, χρησιμοποιήθηκε η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στις συγκεντρώσεις των 0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν επηρέασε τα επίπεδα τόσο του κυτοσολικού όσο και του πυρηνικού Nrf2 (Γράφημα 15A,B,C,D). Όσον αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, στη συγκέντρωση των 3.12 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του κυτοσολικού Nrf2 τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 41.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 16A) και αύξηση του πυρηνικού Nrf2 τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h, 12 h και 18 h κατά 170%, 82.5%, 70% και 55% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 16B). Στη συγκέντρωση των 0.78 mg πρωτεΐνης/ml τα επίπεδα του κυτοσολικού Nrf2 δεν επηρεάστηκαν (Γράφημα 16C) ενώ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του πυρηνικού Nrf2 τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h, 18 h και των 24 h κατά 32%, 53%, 57% και 52% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 16D).

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

Όσον αφορά την HO-1, ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής της έκφρασης πραγματοποιήθηκε στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HO-1 τις χρονικές στιγμές των 3 h και 6 h κατά

19% και 27.5% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 19A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε μείωση της HO-1 στις 24 h κατά 46% σε σχέση με το control (Γράφημα 19B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HO-1 τη χρονική στιγμή των 6 h κατά 23% σε σχέση με το control (Γράφημα 20A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 20B).

Τα επίπεδα έκφρασης της CAT προσδιορίστηκαν επίσης στο ολικό κυτταρόλυμα. Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 3 h κατά 26.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 21A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml παρατηρήθηκε μείωση της CAT στις 24 h κατά 26% σε σχέση με το control (Γράφημα 21B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τις χρονικές στιγμές των 3 h και 6 h κατά 21% και 19% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 22A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 22B).

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της GCS στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα. Βρέθηκε ότι στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GCS τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h και 12 h κατά 20%, 22% και 24% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 23A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 23B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 παρατηρήθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν υπήρξε καμία επίδραση (Γράφημα 24A,B).

#### **2.3.4.β. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT**

Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 29.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 25A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 25B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε



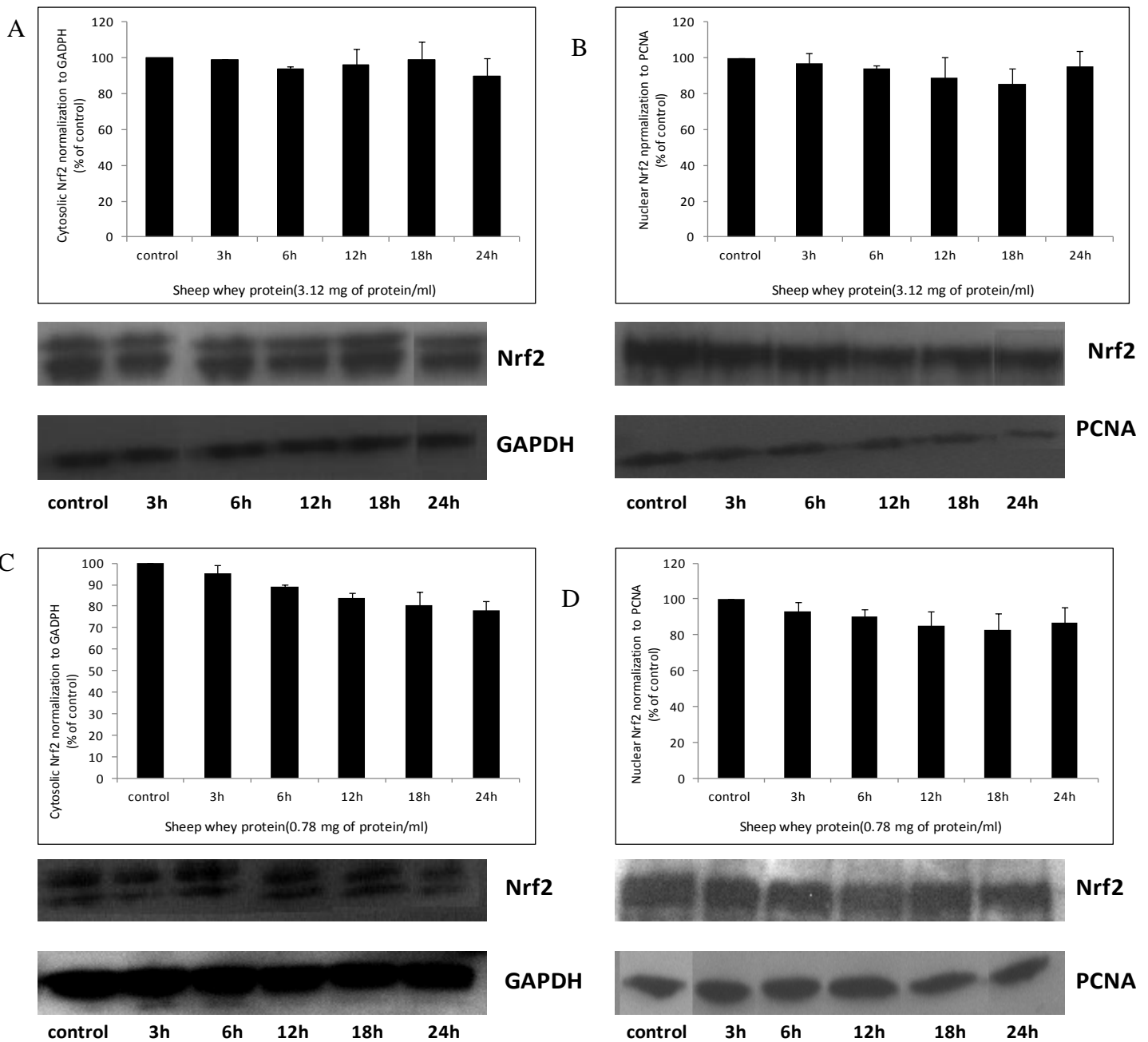
σημαντική αύξηση των επιπέδων της CAT τη χρονική στιγμή των 24 h κατά 84% σε σχέση με το control (Γράφημα 26A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 26B).

#### **2.3.4.γ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD**

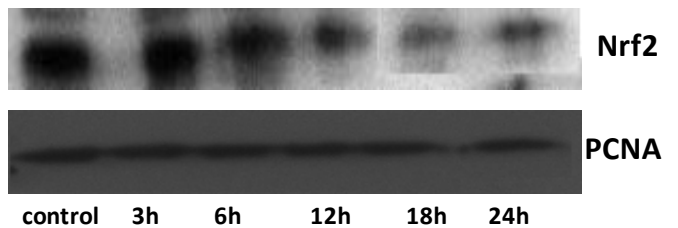
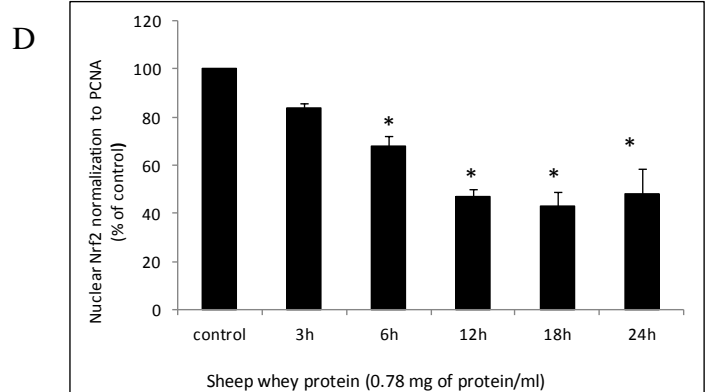
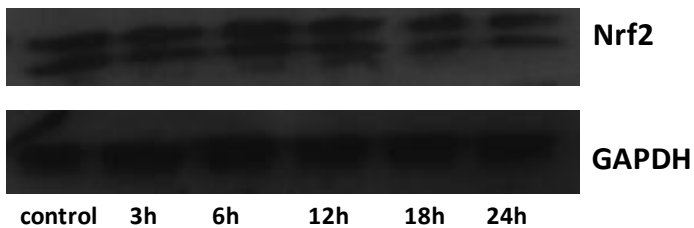
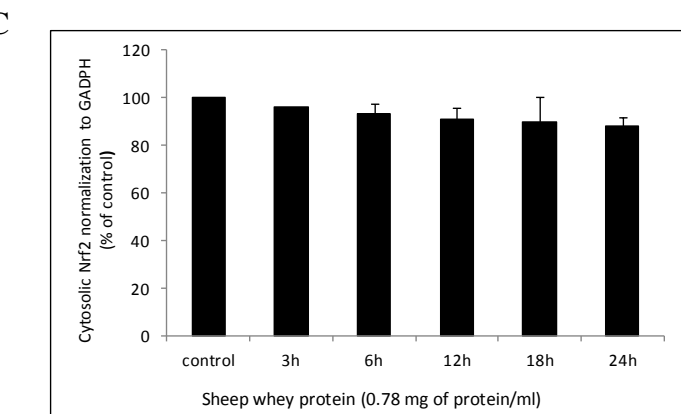
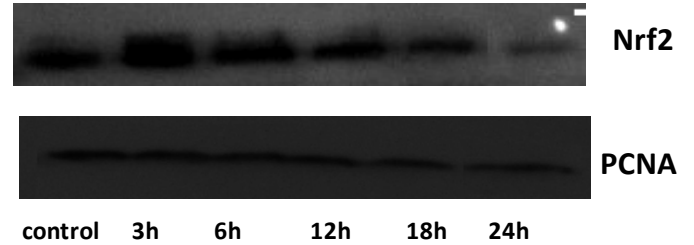
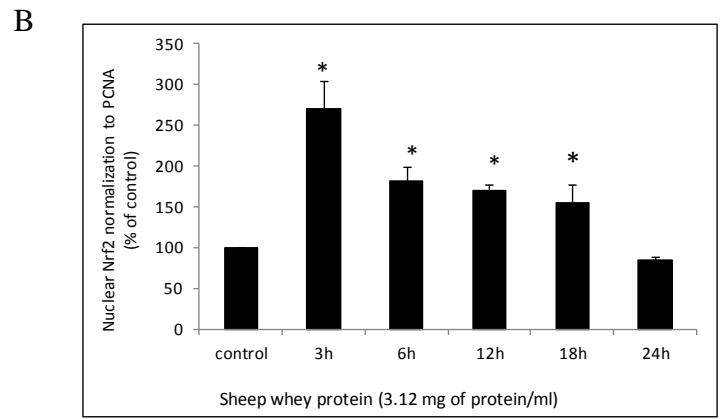
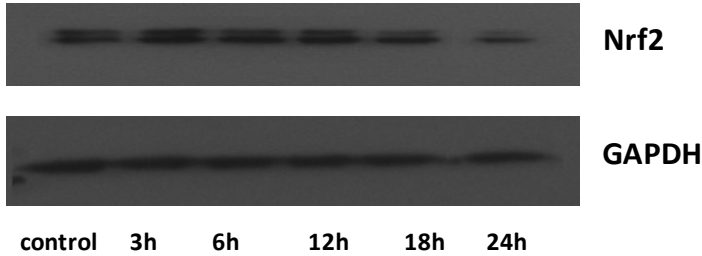
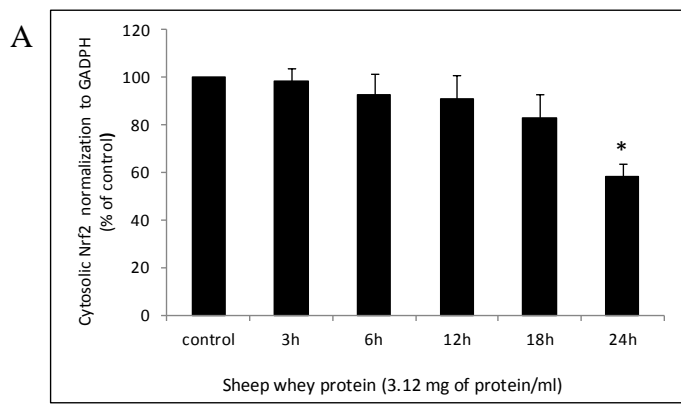
Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD τις χρονικές στιγμές των 3 h, 6 h και 12 h κατά 25.5%, 22% και 17.5% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 27A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 27B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της SOD τις χρονικές στιγμές των 6 h, 12 h και 18 h κατά 35%, 37.5% και 30% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 28A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 28B).

#### **2.3.4.δ. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST**

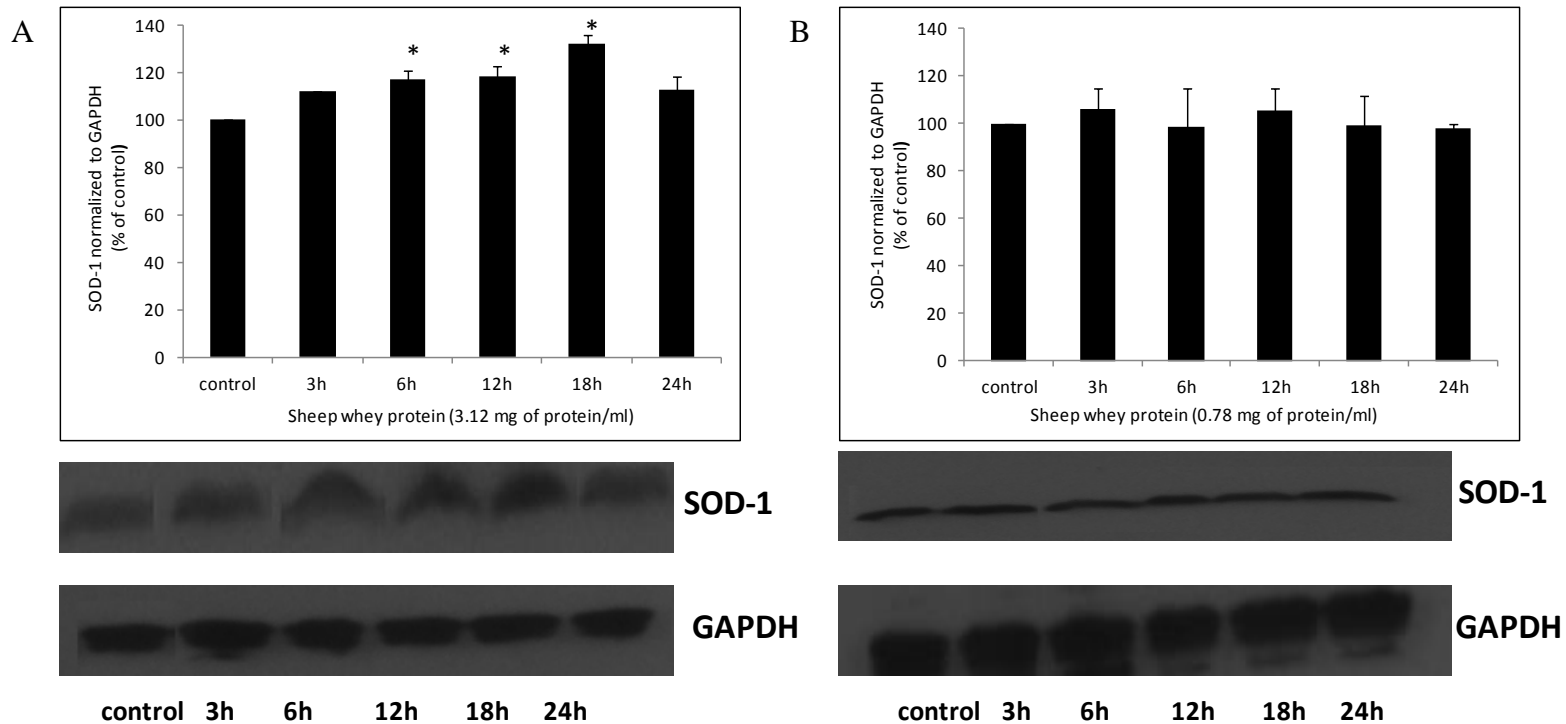
Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GST τη χρονική στιγμή των 6 h κατά 28.5% σε σχέση με το control (Γράφημα 29A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση (Γράφημα 29B). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος στη συγκέντρωση 3.12 mg πρωτεΐνης/ml οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της GST τις χρονικές στιγμές των 18 h και 24 h κατά 33.5% και 31% αντίστοιχα σε σχέση με το control (Γράφημα 30A) ενώ στη συγκέντρωση 0.78 mg πρωτεΐνης/ml δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (Γράφημα 30B).



**Γράφημα 15:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης του Nrf2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (C) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (D) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH και του PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως control κανονικοποίησης για το κυτοσολικό και το πυρηνικό κυτταρόλυμα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean ± SEM.

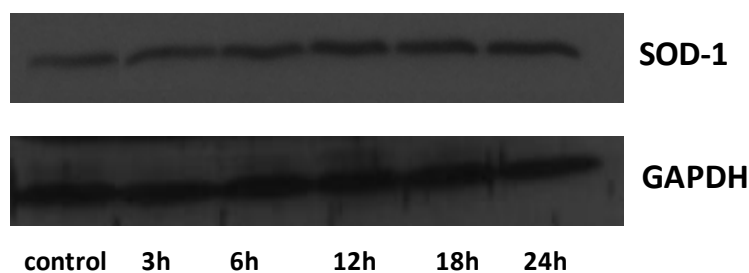
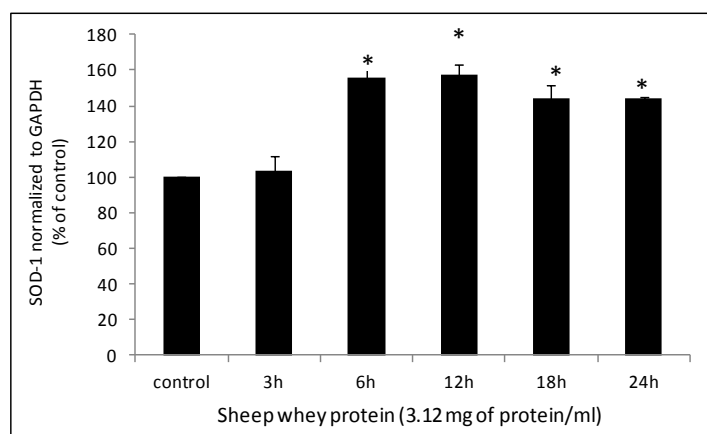


**Γράφημα 16:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης του Nrf2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο κυτταρικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (C) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (D) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης του Nrf2 στο πυρηνικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH και του PCNA χρησιμοποιήθηκαν ως control κανονικοποίησης για το κυτταρικό και το πυρηνικό κυτταρόλυμα αντίστοιχα. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

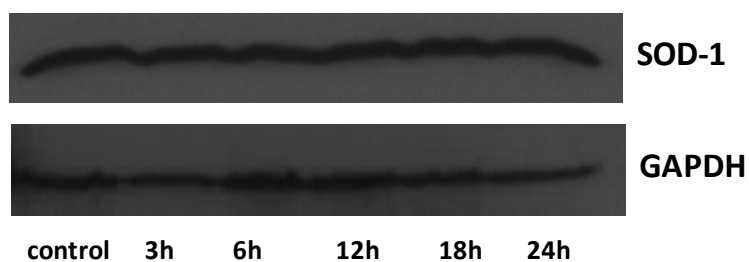
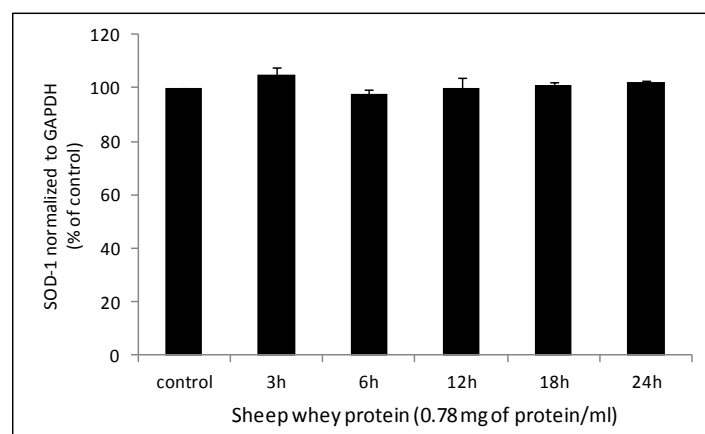


**Γράφημα 17:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της SOD-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

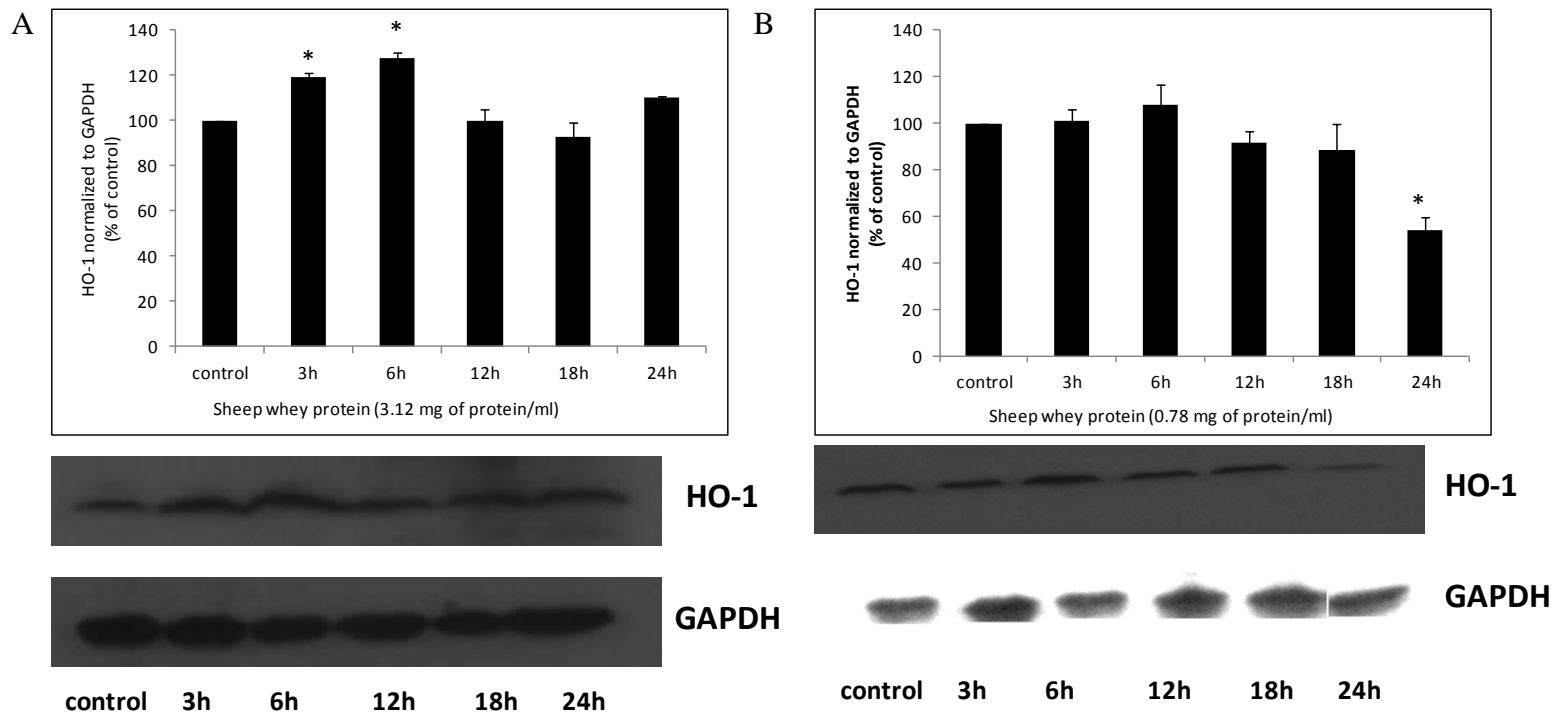
A



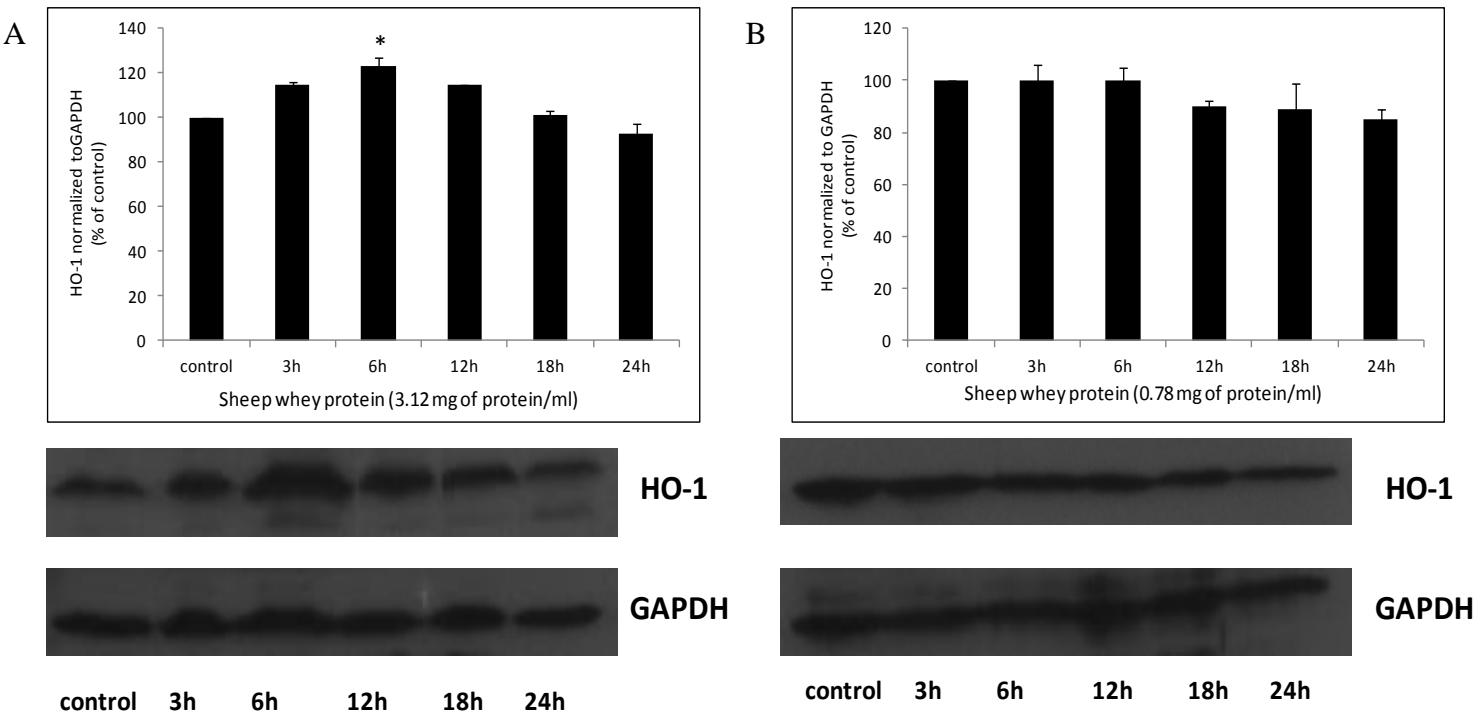
B



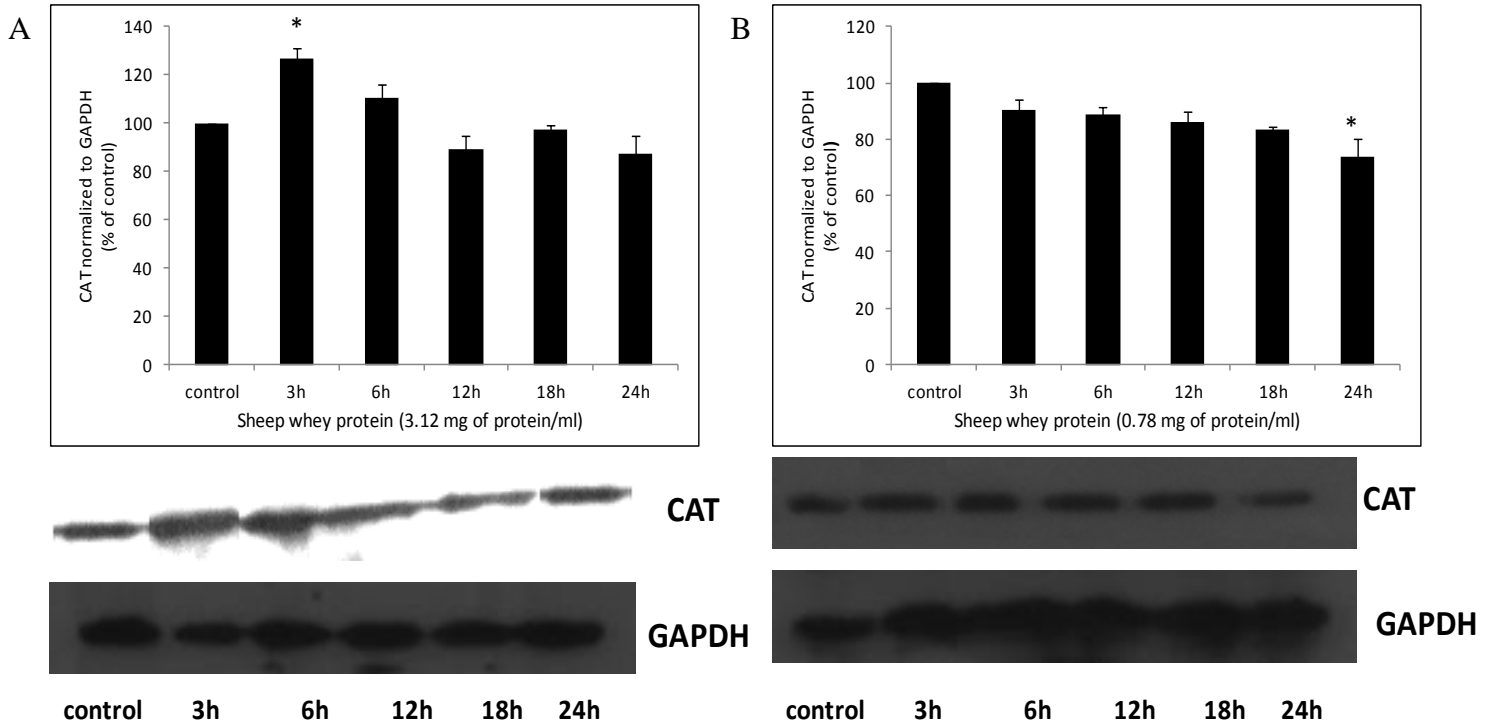
**Γράφημα 18:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση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



**Γράφημα 19:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της HO-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

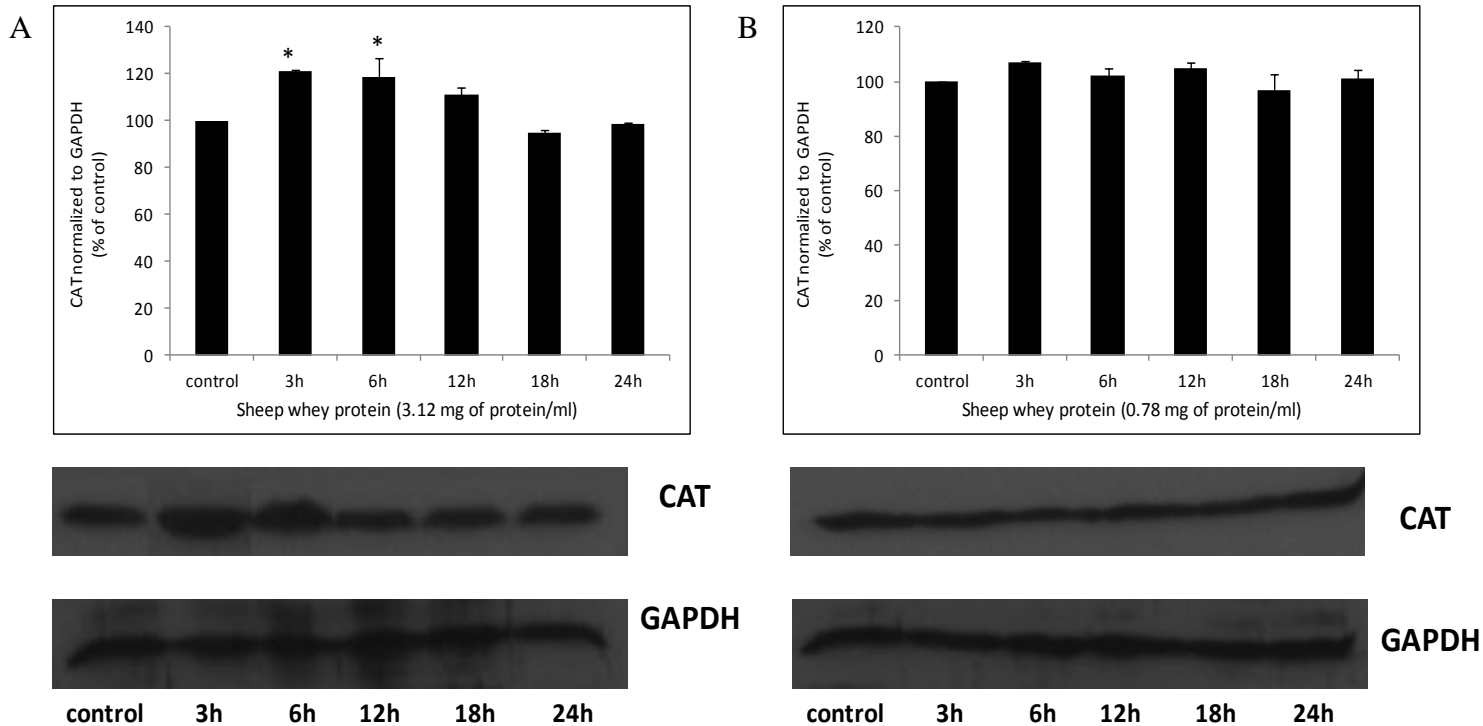


**Γράφημα 20:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της HO-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης HO-1 στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



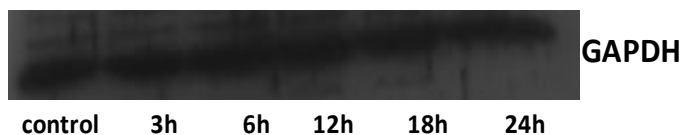
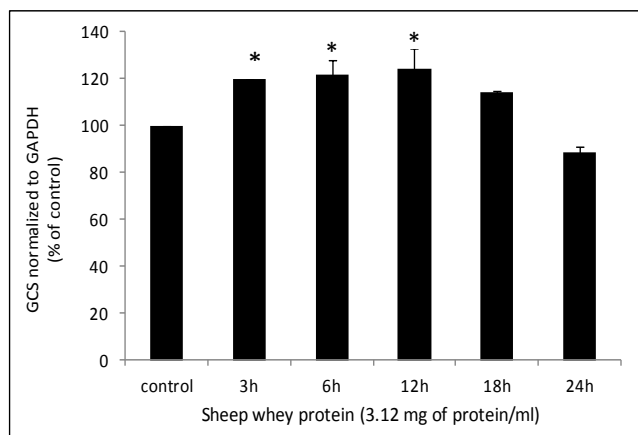
**Γράφημα 21:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της CAT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



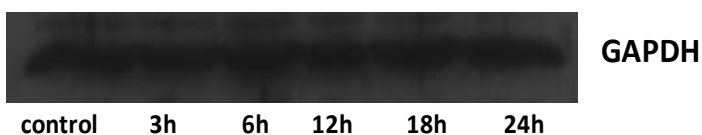
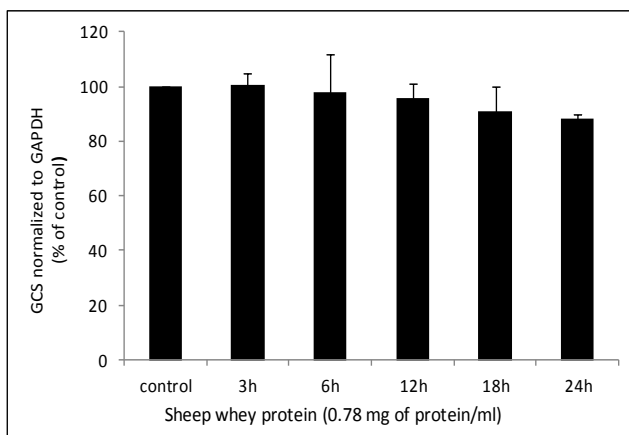


**Γράφημα 22:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της CAT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης CAT στο ολικό κυτταρόλυμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

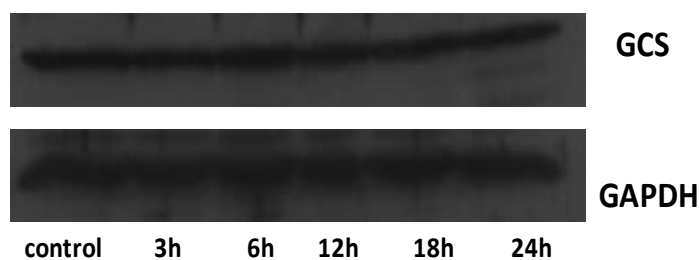
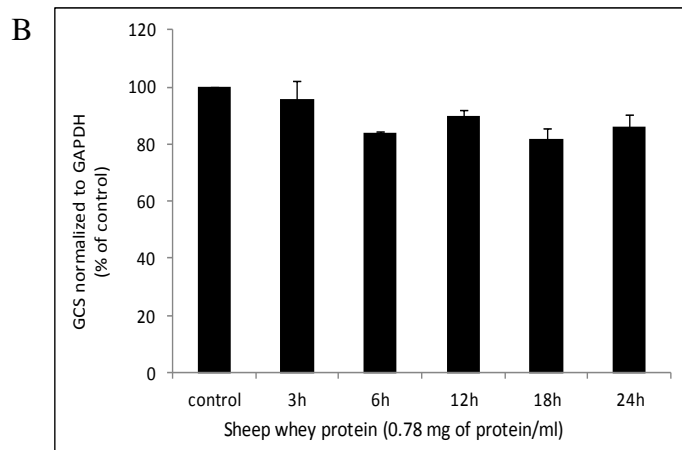
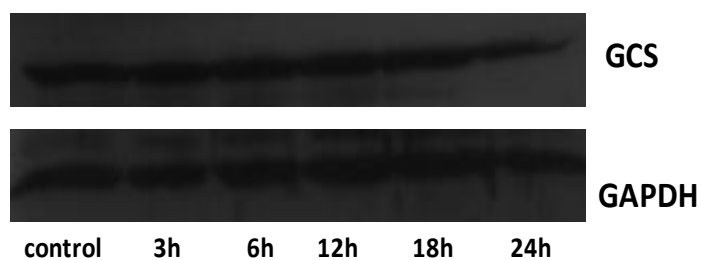
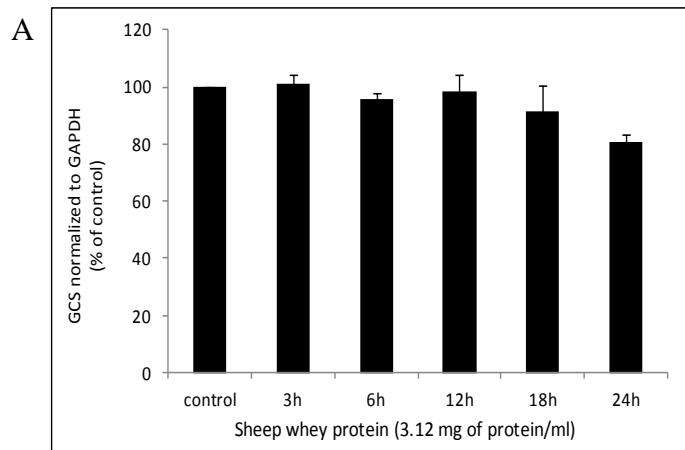
A



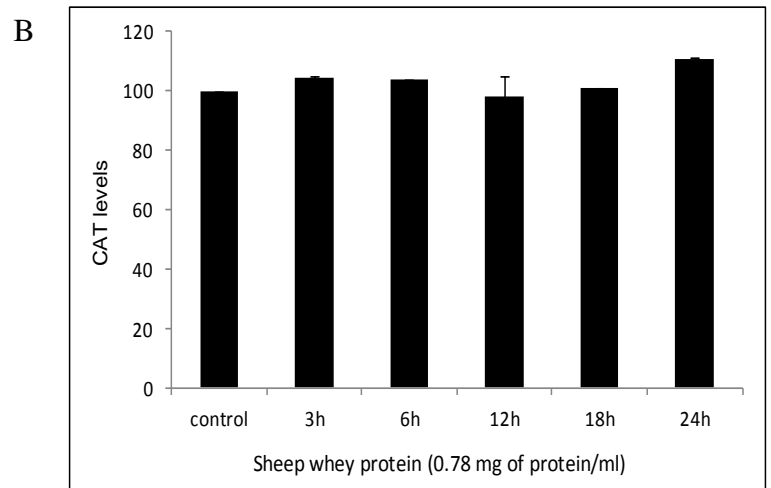
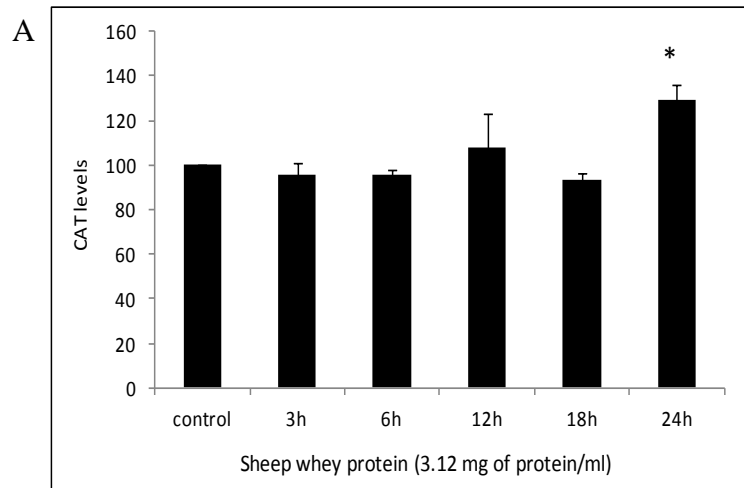
B



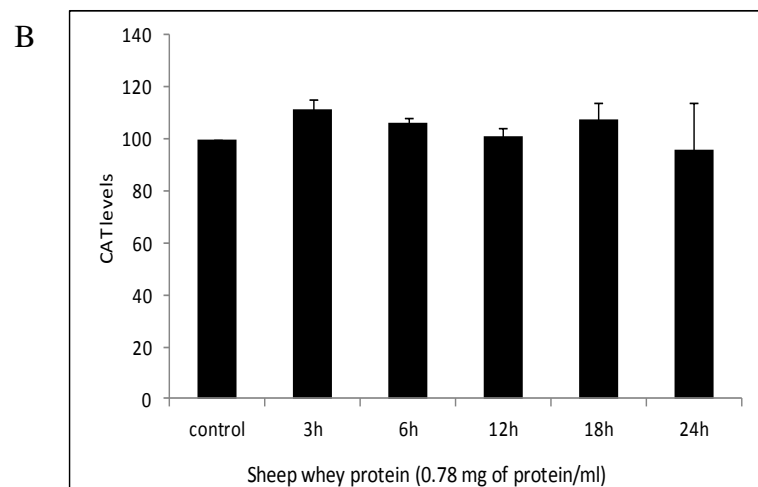
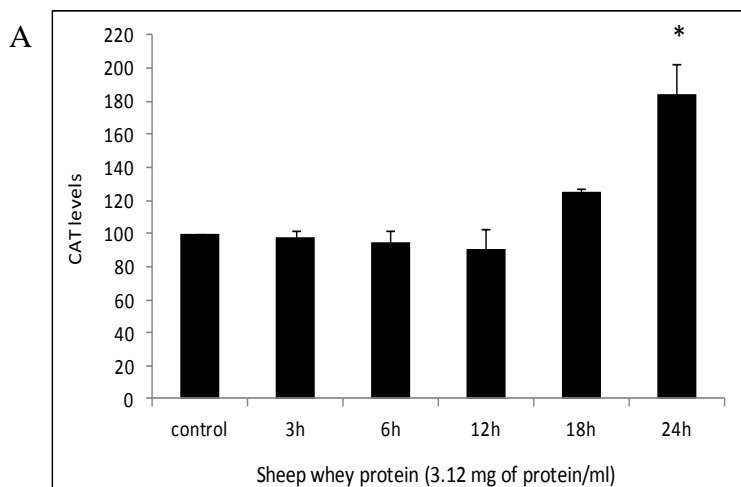
**Γράφημα 23:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Western blot. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτταρικό εκτάρωμα μετά την επώαση με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. (B) Αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα για την ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS στο κυτταρικό εκτάρωμα μετά την επώαση με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml και τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως control κανονικοποίησης. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



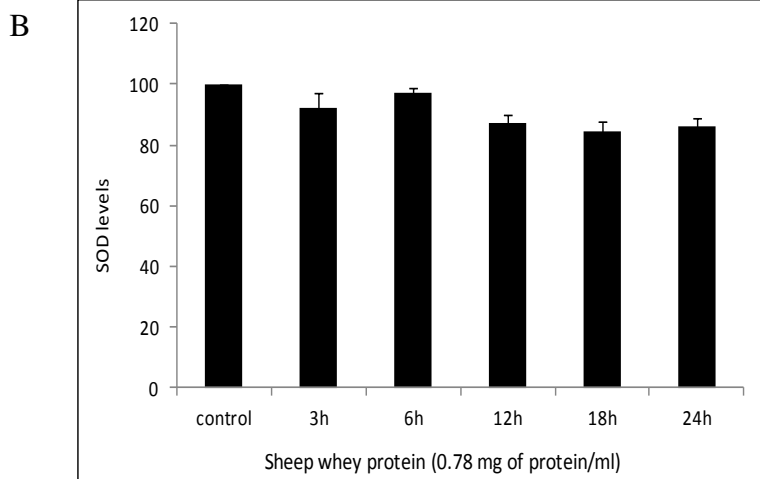
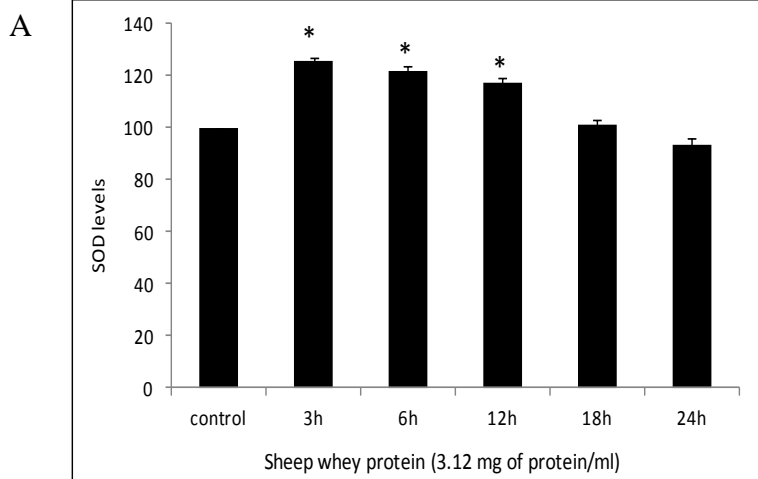
**Γράφημα 24:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24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



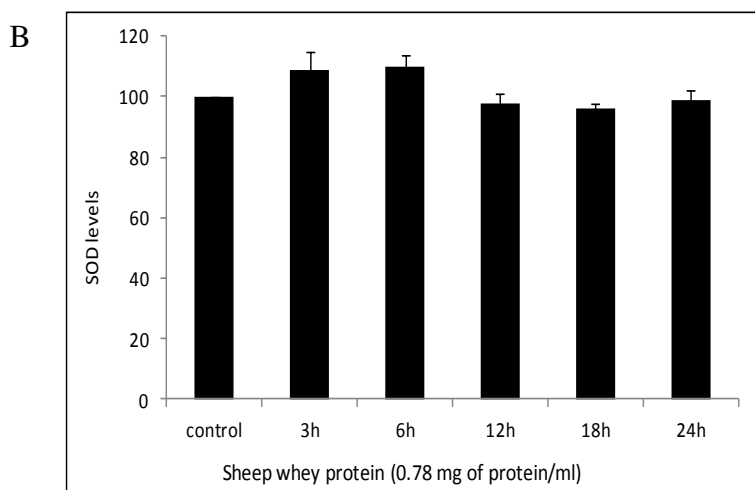
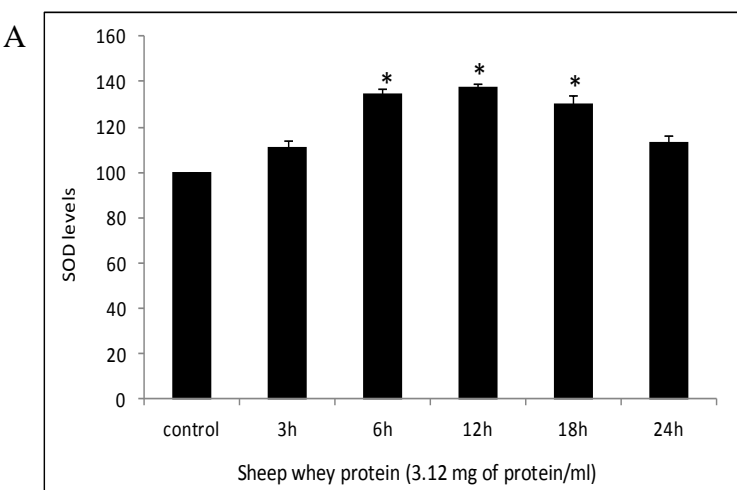
**Γράφημα 25:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



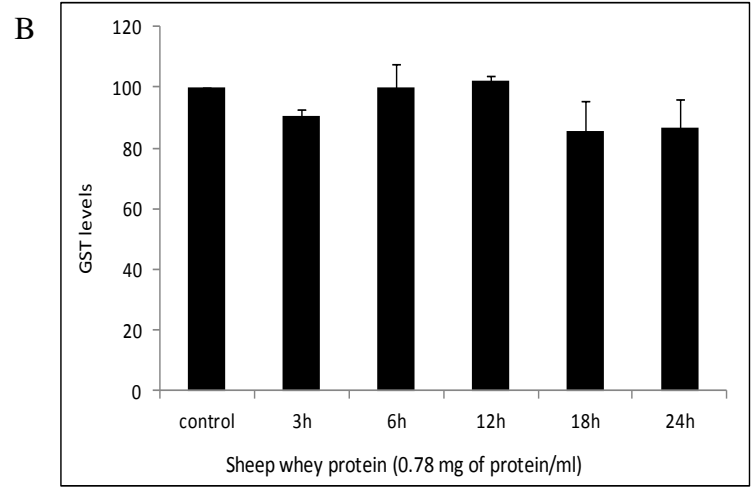
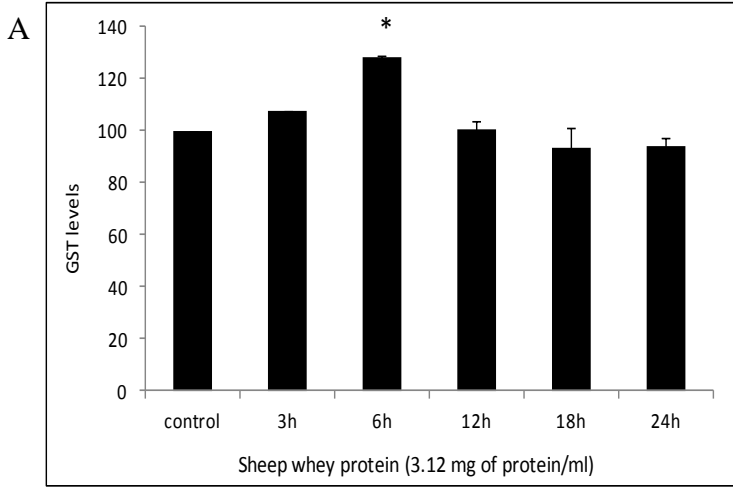
**Γράφημα 26:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της καταλάσης (CAT) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



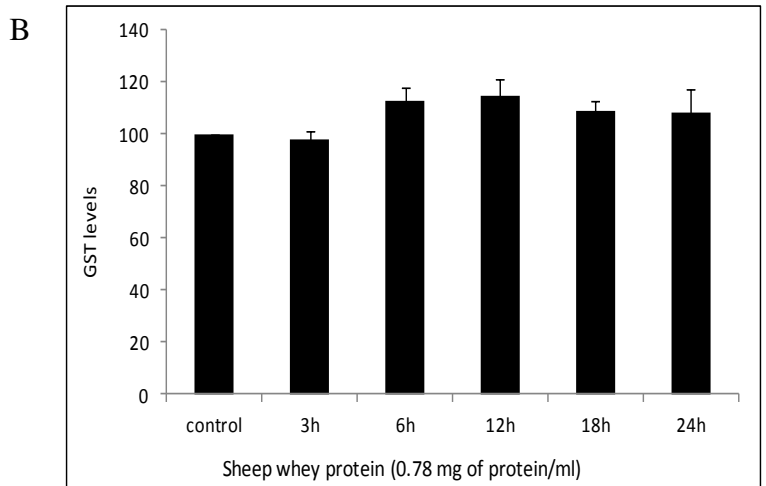
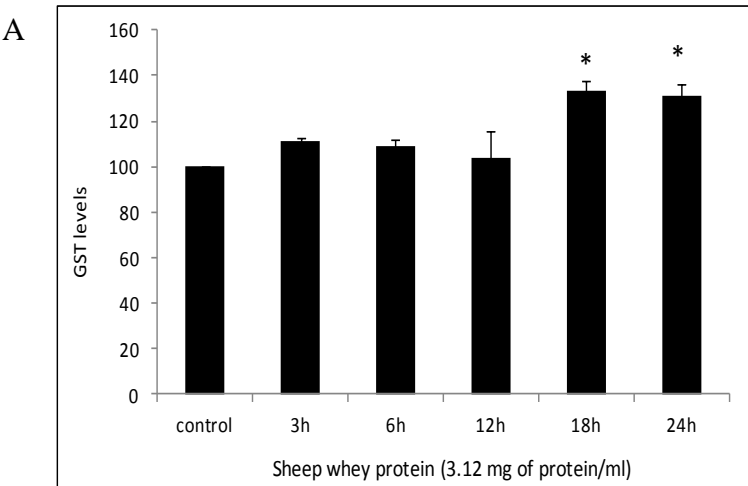
**Γράφημα 27:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 28:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 29:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 30:** Η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην ενζυμική δράση της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (0.78 και 3.12 mg πρωτεΐνης/ml) για 3 h, 6 h, 12 h, 18 h και 24 h. (A) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 3.12 mg πρωτεΐνης/ml. (B) Τα αποτελέσματα της ενζυμικής δράσης εκφρασμένα σε εκατοστιαίο επίπεδο σε σχέση με το control μετά από επώαση των κυττάρων με 0.78 mg πρωτεΐνης/ml. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

### 2.3.5. Συζήτηση

Η ενεργοποίηση ενός αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. CAT, SOD) αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό για τον περιορισμό της μεσολαβούμενης από ROS κυτταρικής βλάβης (Van & Kuiperij, 2005; Schreiber et al., 2007). Η μεταγραφή αυτών των κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της μεταγραφής του πυρηνικού Nrf2, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση (Ito et al., 2003). Κάτω από βασικές συνθήκες, ο Nrf2 βρίσκεται δεσμευμένος στο κυτταρόπλασμα με την πρωτεΐνη Keap1 η οποία με τη σειρά της διευκολύνει την ουβικουϊτινίωση και επακόλουθη πρωτεόλυση του Nrf2. Μετά την πρόκληση οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 αποδεσμεύεται από την Keap1 και μετατοπίζεται στον πυρήνα (Kensler et al., 2007) όπου προσδένεται στα AREs πολλών κυτταροπροστατευτικών γονιδίων (Rushmore & Pickett, 1990). Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, καθώς και στην πρωτεϊνική έκφραση και δράση ενός αριθμού ενζύμων ( SOD-1, HO-1, CAT, GCS, GST) στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει τις επιδράσεις της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2 και ενός αριθμού κυτταροπροστατευτικών ενζύμων και μία από τις λίγες που μελετούν την ενζυμική τους δράση.

Στα μυϊκά κύτταρα C2C12 η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε κάποια επίδραση τόσο στα επίπεδα του κυτοσολικού όσο και του πυρηνικού Nrf2. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος μείωσε τα επίπεδα του κυτοσολικού Nrf2 και αύξησε τα επίπεδα του πυρηνικού Nrf2. Πιθανώς η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είτε μέσω οξειδωτικής τροποποίησης της κυστεΐνης της πρωτεΐνης Keap1, η οποία συγκρατεί τον Nrf2 στο κυτοσόλιο, είτε μέσω φωσφορυλίωσης του Nrf2 μπορεί να οδηγήσει στην αποδέσμευση του και την μετατόπιση του στον πυρήνα. Έχει βρεθεί ότι συμπυκνωμένα κλάσματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος χαμηλού μοριακού βάρους ενεργοποιούν τις κινάσες JNK και ERK (Tsujii-Naito & Jack, 2012). Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να προκαλεί φωσφορυλίωση της Keap1 μέσω αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρουσιάζει όμως ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος επάγει την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 μόνο στα EA.hy926 κύτταρα.

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

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

Ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που μελετήθηκε τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ενζυμικής δράσης είναι η CAT. Η CAT είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$ , ένα δραστικό μόριο που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, σε  $H_2O$  και  $O_2$ . Στα C2C12 κύτταρα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της CAT έως και 26.5%. Στα EA.hy926 κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της CAT έως και 21%. Πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης της CAT τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα και βρέθηκε ότι αυξήθηκαν τα επίπεδα της κατά 29.5% και 84% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα είναι αυτά προηγούμενης μελέτης που έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε C2C12 κύτταρα αύξησε τα επίπεδα της ενζυμικής δράσης της CAT (Xu et al., 2011).

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



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

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

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

ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι στα C2C12 μπορεί να είναι ενεργοποιημένο κάποιο άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), το οποίο οδηγεί στη μεταγραφή αυτών των γονιδίων και το οποίο παρεμβάλεται στην ενεργοποίηση του Nrf2.

Συμπερασματικά, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μέσω της επαγωγής ενός αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II. Ωστόσο ήταν σημαντικό ότι στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων γινόταν μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2/ARE, ενώ στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μέσω ενεργοποίησης κάποιου άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού. Άρα, ο μοριακός μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος είναι εξαρτώμενος από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο δρα. Δεδομένου ότι το μονοπάτι Nrf2/ARE λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, μπορεί χρησιμεύει ως θεραπευτικός στόχος για διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκινογένεσεις στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ενεργοποίηση του Nrf2 ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που σχετίζονται με βλάβες του ενδοθηλίου από το οξειδωτικό στρες.

## **2.4. Επίδραση σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους**

### **2.4.1. Γενικά**

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η άσκηση προκαλεί υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών. Μια ποσότητα αυτών των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για φυσιολογικές διαδικασίες όπως μεταγωγή σήματος (Ji, 2007; Wells et al., 2009), γονιδιακή έκφραση (Ji et al., 2006) και προσαρμογή κατά την άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005). Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη μακρομορίων (Veskoukis et al., 2008), δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού (Schneider & Tiidus, 2007), μυϊκή βλάβη (Nikolaidis et al., 2007) και κόπωση (Betters et al., 2004). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η άσκηση που προκαλεί μυϊκή βλάβη οδηγεί επίσης σε οξειδωτικό στρες και τα επιβλαβή αποτελέσματα του διαρκούν για μερικές ημέρες μετά το τέλος της (Nikolaidis et al., 2008). Ως εκ τούτου η αποκατάσταση των αθλητών μετά από σοβαρή άσκηση είναι αργή και η αθλητική απόδοση δεν είναι η βέλτιστη. Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να βελτιώσουν την αθλητική απόδοση με χορήγηση ροφημάτων πλούσιων σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, κάποιες φορές χρησιμοποιώντας ως πηγή πρωτεΐνης τον ορό γάλακτος, με αντιφατικές επιπτώσεις στην απόδοση (Baty et al., 2007; Betts et al., 2007; Ferguson-Stegall et al., 2010; Haff et al., 2000; Ivy et al., 2002).

Ο ορός γάλακτος θεωρείται ένα υποπροϊόν της παρασκευής τυριού, αλλά τα τελευταία χρόνια περιγράφεται ως λειτουργικό τρόφιμο (Marshall, 2004). Ο ορός γάλακτος είναι ένα συμπλήρωμα διατροφής που παρέχει αντιμικροβιακή δράση, ρυθμίζει το ανοσοποιητικό και συμμετέχει στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (Marshall, 2004). Περιέχει υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας όπως βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική σύνθεση. Επίσης, ο ορός γάλακτος είναι πλούσιος σε κυστεΐνη και μεθειονίνη που συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής τους σε γλουταθειόνη (Marshall, 2004).

Σχετικές μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν εξετάσει τις επιπτώσεις χορήγησης υγρών σκευασμάτων πλούσιων σε υδατάνθρακες ή πρωτεΐνες στην απόδοση. Μελέτες που να έχουν εξετάσει τις επιδράσεις υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε μορφή άλλη πέραν της υγρής λείπουν. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα αποτελέσματα ενός σκευάσματος σε μορφή κέικ που αποτελείται από συγκεκριμένη αναλογία

υδατανθράκων-πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε αθλητές μετά από εξαντλητική άσκηση.

#### **2.4.2. Υλικά και Μέθοδοι**

##### **2.4.2.α. Σκεύασμα υδατανθράκων-πρωτεΐνης ορού γάλακτος (αναλογία 3.5:1).**

Για την ανάπτυξη του σκευάσματος, ως κύρια πηγή πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος, ενώ ως κύρια πηγή υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η σουκρόζη. Η απομόνωση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος πραγματοποιήθηκε στο εργοστάσιο παραγωγής πρωτεϊνών από την επεξεργασία ορού γάλακτος στην Καρδίτσα. Το τελικό προϊόν επιλέχθηκε μετά από αξιολόγηση των φυσικών (υφή, χρώμα, ειδικός όγκος, υγρασία) και οργανοληπτικών (μέθοδος στρογγυλής τραπέζης) χαρακτηριστικών του στο Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων του Τεχνολογικού Ιδρύματος Αθηνών σε συνεργασία με το εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων (Διευθυντής εργαστηρίου: Ζόγκζας Νικόλαος). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του ενεργειακού περιεχομένου του επιλεγμένου σκευάσματος με τη μέθοδο της θερμιδομετρίας στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών (Διευθυντής εργαστηρίου: Καραθάνος Βάιος). Το εικονικό σκεύασμα δεν περιείχε πρωτεΐνη ορού γάλακτος.

### Μέση διαθρεπτική επισήμανση/ Average nutrition facts

	Ανά 100 gr	Ανά μερίδα 70 gr	% GDA *
	Per 100 gr	Per portion 70 gr	(70 gr)
<b>Ενέργεια/Energy</b>	373 kcal/1.563 kj	261 kcal/1.094 kj	13%
<b>Πρωτεΐνες/Proteins</b>	12.9	9	18%
<b>Πρωτεΐνες ορού γάλακτος/ Whey proteins</b>	10.5	7.3	
<b>Λοιπές πρωτεΐνες/ other proteins</b>	2.4	1.7	
<b>Υδατάνθρακες/ Carbohydrates</b>	43.1	30.2	11%
<b>Σάκχαρα/ Sugars</b>	22.8	16	18%
<b>Άμυλο/ Starch</b>			
<b>Λιπαρές ύλες/ Fats</b>	16.5	11.6	17%
<b>Κορεσμένα/ Saturated</b>	1.3	0.9	5%
<b>Ακόρεστα/ Unsaturated</b>	15.2	10.7	
<b>Φυτικές ίνες/</b>	1.5	1.1	4%
<b>Νάτριο/ Sodium</b>	0.22	0.16	7%

---

**Πίνακας 5:** Θρεπτικά συστατικά του σκευάσματος υδατανθράκων-αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

#### 2.4.2.β. Συμμετέχοντες

Εννέα σωματικά δραστήριοι άνδρες (ηλικίας,  $28 \pm 2$  χρόνων; ύψος,  $184 \pm 3$  εκατοστά; βάρος,  $77 \pm 2$  κιλά; σωματικό λίπος,  $11 \pm 2\%$ ; δείκτης μάζας σώματος ( $23 \pm 1 \text{ kg/m}^2$ ;  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ,  $4.1 \pm 0.2 \text{ L/min mean} \pm \text{sem}$ ) συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη. Οι συμμετέχοντες κάνανε προπόνηση τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα για τουλάχιστον τρεις ώρες και είχαν ένα ιστορικό προπόνησης για τουλάχιστον δύο χρόνια. Ήταν μη καπνιστές και δεν λάμβαναν αντι-φλεγμονώδη φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής. Η μέτρηση του  $\text{VO}_{2\text{max}}$  διασφάλισε ότι η άσκηση τους ήταν στα ίδια επίπεδα έντασης. Με γραπτή τους συγκατάθεση οι συμμετέχοντες πήραν μέρος στην μελέτη, αφού προηγουμένως είχαν ενημερωθεί για τους κινδύνους, τις ταλαιπωρίες και τα

οφέλη. Οι διαδικασίες ήταν σύμφωνες με τη δήλωση του Ελσίνκι του 1975 και έγκριση δόθηκε από την επιτροπή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Οι συμμετέχοντες επισκέφθηκαν το εργαστήριο για πρώτη φορά με σκοπό την ανάλυση των ανθρωπομετρικών παραμέτρων τους και τη συμπλήρωση ερωτηματολογίου για την υγεία και τη δραστηριότητα τους. Μετά από ολονύκτια νηστεία και αποχή από το αλκοόλ και την καφεΐνη για 24 ώρες, μετρήθηκε η μάζα σώματος τους με ακρίβεια 0,5 kg (Beam Balance 710, Seca, UK) με τους συμμετέχοντες ελαφρά ντυμένους και ξυπόλυτους. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm (Stadiometer 208, Seca). Το ποσοστό λίπους υπολογίστηκε από τη μέτρηση επτά δερματοπτυχών (μέσος όρος δύο μετρήσεων κάθε σημείου), χρησιμοποιώντας ένα δερματοπτυχόμετρο Harpenden (John Bull, UK), σύμφωνα με δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες (American College of Sports Medicine, 2000). Ο δείκτης μάζα σώματος υπολογίστηκε ως ο λόγος του βάρους σώματος (kg) / ύψος (cm<sup>2</sup>). Ο VO<sub>2max</sub> υπολογίστηκε μετά από ένα τεστ μέγιστης κατανάλωσης σε εργομετρικό ποδήλατο (Monark 834E, Sweden). Το πρωτόκολλο ξεκίνησε στο 1,5 kg (-70RPM) για 1 λεπτό και αυξανόταν 0,5 kg για κάθε 2 λεπτά, μέχρι ο VO<sub>2max</sub> να επιτευχθεί. Οι μεταβλητές των αναπνευστικών αερίων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα μεταβολικό καλάθι (Vmax29; Sensormedics, USA), το οποίο βαθμονομούνταν πριν από κάθε τέστ με τη χρήση πρότυπων αερίων γνωστής συγκέντρωσης. Ο καρδιακός ρυθμός παρακολούθηθηκε με τηλεμετρία (Polar Tester, S610TM, Electro Oy, Finland).

#### **2.4.2.γ. Διατροφή και άσκηση πριν από το πείραμα**

Οι συμμετέχοντες καθοδηγήθηκαν να ακολουθήσουν τις συνηθισμένες διατροφικές τους συνήθειες κατά τη διάρκεια των ημερών του πειράματος. Τους ζητήθηκε να καταγράψουν τη διατροφή τους τρεις ημέρες πριν την πρώτη περίοδο άσκησης και δύο ημέρες μετά. Όλοι οι εθελοντές είχαν την εντολή να απέχουν από έντονη σωματική δραστηριότητα δύο ημέρες πριν και δύο ημέρες μετά το πείραμα. Όλοι οι συμμετέχοντες έλαβαν ένα αντίγραφο του διατροφικού τους φύλλου και τους ζητήθηκε να ακολουθήσουν τις ίδιες διατροφικές συνήθειες πριν από τη δεύτερη πειραματική τους συνεδρία.

#### 2.4.2.δ. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο κάθε συμμετέχων έλαβε μέρος σε δύο δοκιμές με έναν αντισταθμιζόμενο τρόπο (το κάθε άτομο έλαβε τόσο το πειραματικό όσο και το εικονικό κέικ με τυχαία σειρά) χρησιμοποιώντας έναν διασταυρούμενο, διπλά-τυφλό, επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σχεδιασμό. Οι συμμετέχοντες επισκέφτηκαν το εργαστήριο για δεύτερη φορά μετά τον προσδιορισμό του  $VO_{2max}$  (08:00-09:00 το πρωί) και συμμετείχαν είτε στην πειραματική είτε στην εικονική δοκιμασία. Οι δύο πειραματικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με κενό μιας εβδομάδας μεταξύ τους. Κατά τη διάρκεια κάθε δοκιμής, ο κάθε συμμετέχων καταλάωνε είτε το πειραματικό κέικ που παρείχε 0,9 g υδατανθράκων / kg σωματικού βάρους / ώρα και 0,28 g πρωτεΐνης / kg σωματικού βάρους / ώρα (αναλογία υδατανθράκων-πρωτεϊνών 3.5:1) ή ένα εικονικό κέικ που παρείχε 1,1 g υδατανθράκων / kg σωματικού βάρους / ώρα και 0,1 g πρωτεΐνης / kg σωματικού βάρους / ώρα.

Το πειραματικό πρωτόκολλο αποτελείται από τις ακόλουθες φάσεις:

- (I) 2 ώρες συνεχόμενης ποδηλασίας σε εργομετρικό ποδήλατο (Monark 834E, Sweden) με ένταση που αντιστοιχεί στο 60-65% του  $VO_{2max}$
- (II) 4 ώρες αποκατάσταση
- (III) 1 ώρα συνεχόμενης ποδηλασίας στο 60-65% του  $VO_{2max}$
- (IV) ποδηλάτηση στο 95% του  $VO_{2max}$  μέχρι εξάντλησης
- (V) 1 ώρα αποκατάστασης (Εικόνα 16).

Η άσκηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία  $21 \pm 2$  °C και υγρασία  $45 \pm 4\%$ . Για να μετριάσει η δυσφορία των συμμετεχόντων, νερό ήταν διαθέσιμο *ad libitum* κατά τη διάρκεια του πειράματος και η κατανάλωση του καταγράφηκε. Τα εκπνεόμενα αέρια καταγραφόντουσαν κάθε 15 λεπτά για να εξασφαλιστεί η προδιαγραφόμενη ένταση της άσκησης. Η αντιληπτή κόπωση των συμμετεχόντων καταγραφόταν κάθε 15 λεπτά με τη χρήση της κλίμακας Borg κατά τη διάρκεια της φάσης I και III και στο τέλος της φάσης V. Η λήψη των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε πριν την άσκηση (T1), 30 λεπτά μετά την άσκηση (T2), 1,5 ώρα μετά την άσκηση (T3), 4 ώρες μετά την άσκηση (T4), αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση (T5), 1 ώρα μετά την εξαντλητική άσκηση (T6), 24 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση (T7) και 48 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση (T8) (Εικόνα 26). Η κατανάλωση του πειραματικού ή του εικονικού κέικ πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την άσκηση και κάθε μία ώρα για τις επόμενες τρεις ώρες. Η διαδικασία κοπώσεως, η χορήγηση του κέικ και οι αιμοληψίες

πραγματοποιήθηκαν την ίδια ώρα της ημέρας και με την ίδια σειρά πριν και μετά την πρώτη δοκιμή (Εικόνα 26Α) καθώς και πριν και μετά τη δεύτερη δοκιμή (Εικόνα 26Β).

#### **2.4.2.ε. Οξείδωση υδατανθράκων και λίπους**

Τα ποσοστά οξείδωσης του λίπους και των υδατανθράκων ( $\text{g min}^{-1}$ ) κατά τη διάρκεια της υπομέγιστης άσκησης υπολογίστηκαν έμμεσα με παρακολούθηση του ρυθμού κατανάλωσης του  $\text{O}_2$  ( $\text{L min}^{-1}$ ) και της παραγωγής  $\text{CO}_2$  ( $\text{L min}^{-1}$ ), χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες στοιχειομετρικές εξισώσεις (Jeukendrup and Wallis, 2005), υποθέτοντας ότι η πρωτεϊνική οξείδωση κατά τη διάρκεια της άσκησης ήταν αμελητέα:

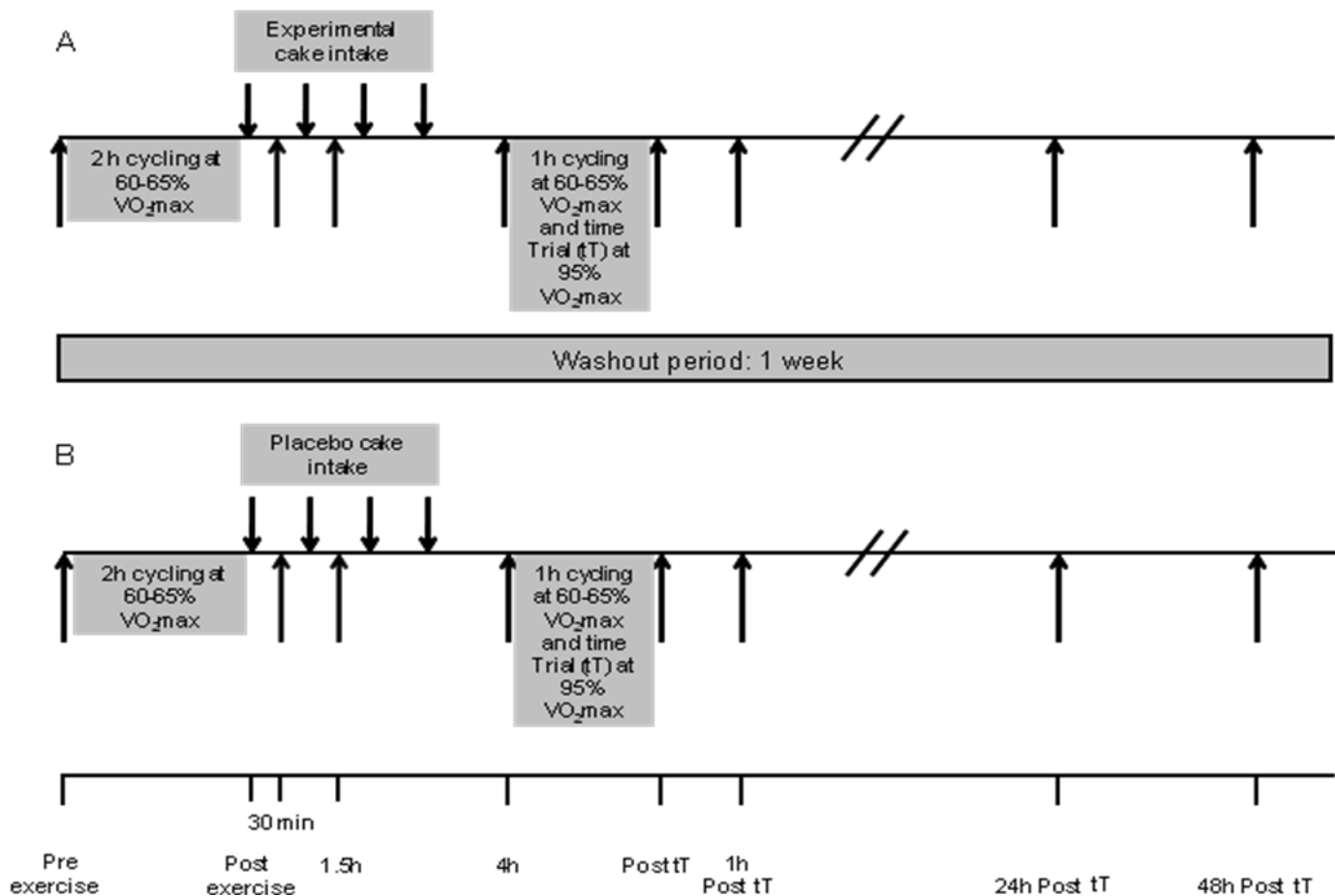
$$\text{Λιπιδική οξείδωση} = 1,695\text{VO}_2 - 1,701\text{VCO}_2$$

$$\text{Οξείδωση υδατανθράκων} = 4,210\text{VO}_2 - 2,962\text{VCO}_2$$

#### **2.4.2.στ. Συλλογή αίματος και χειρισμός**

Το αίμα συλλέχθηκε σε σωλήνες αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), φυγοκεντρήθηκε αμέσως στα 1370 g για 10 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$  και το πλάσμα συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με απεσταγμένο νερό (1:1 v/v), ανακινήθηκαν έντονα, φυγοκεντρήθηκαν στα 4020 g για 15 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$  και το ερυθροκυτταρικό κυτταρόλυμα συλλέχθηκε για τη μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης. Ένα μέρος του ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος (500  $\mu\text{L}$ ) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 5% τριχλωροοξικό οξύ (TCA) (1:1 v/v), ανακινήθηκαν έντονα και φυγοκεντρήθηκαν στα 28000 g για 5 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ . Τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν, επεξεργάστηκαν ξανά με 5% TCA (1:1 v/v) και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στα 28000 g για 5 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ . Τα διαυγή υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια erpendorf και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της GSH. Μια ποσότητα αίματος (1 mL) αναμίχθηκε αμέσως με EDTA για την πρόληψη της πήξης του αίματος για τις αιματολογικές μετρήσεις. Το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό κυτταρόλυμα στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους  $-80^\circ\text{C}$  μέχρι να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές αναλύσεις.





**Εικόνα 26:** Πειραματικός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου άσκησης. Τα βέλη προς τα κάτω δείχνουν τη χρονική στιγμή λήψης του πειραματικού (A) ή του εικονικού (B) κέικ. Τα βέλη προς τα πάνω δείχνουν τη χρονική στιγμή αιμοληψίας.

#### 2.4.2.ζ. Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) και το διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% w/v) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA) και το χημικό αντιδραστήριο 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-thiobarbituric acid, TBA) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany).

#### 2.4.2.η. Μέθοδοι

##### 2.4.2.η.ι. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

Από τους πιο συνηθισμένους δείκτες εκτίμησης της οξειδωσης των λιπιδίων είναι η συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, TBARS (Keles et al., 2001). Ο δείκτης αντικατοπτρίζει κυρίως την μηλονική διαλδεύδη (MDA) που

αποτελεί το κύριο προϊόν της οξειδωσης των λιπιδίων, και έχει την ικανότητα να αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Πιο αναλυτικά, 100 μl πλάσματος αναμειγνύονται με 500 μl διαλύματος 35% TCA και 500 μl διαλύματος τρις- υδροχλωρικό οξύ (Tris-HCl) (200 mM, pH 7.4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml διαλύματος 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυσταλλώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 15.000 g για 3 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα που δεν περιείχαν ποσότητα πλάσματος αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = (\text{Abs sample} - \text{Abs blank}) / 0,156 \times 31$$

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

Abs blank: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

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

Τιμή 31: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L πλάσματος [3100 } \mu\text{L /100 } \mu\text{L]}$ ).

#### **2.4.2.η.ii. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι δείκτες πρωτεϊνικής οξειδωσης. Καρβονυλικές ομάδες όπως οι αλδεϋδες και οι κετόνες δημιουργούνται στην πλευρική πρωτεϊνική αλυσίδα κυρίως της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της θρεονίνης. Ο σχηματισμός καρβονυλίων ανιχνεύεται από την αντίδραση με την 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) και τη μετατροπή σε 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνη (DNP-υδραζόνη).

Πιο αναλυτικά, 50  $\mu\text{L}$  20% TCA προστίθενται σε 50  $\mu\text{L}$  πλάσματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 $\mu\text{L}$  DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 500 $\mu\text{L}$  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 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά 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 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000g για 3 λεπτά 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:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0,022 \times 20] / 70.$$

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

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

$\epsilon_{375}\text{DNPH}$  (nmol/mL): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

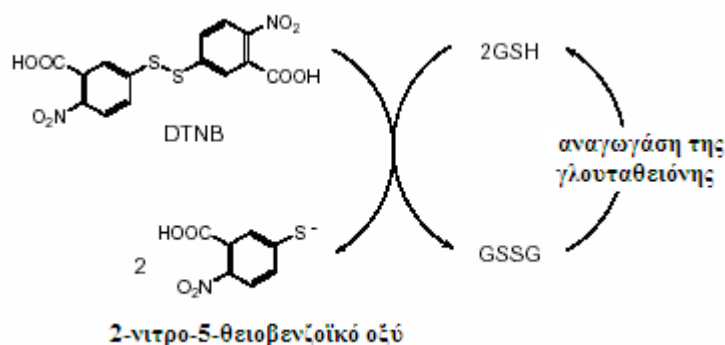
Τιμή 20: Ο συντελεστής αραιώσης  $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L πλάσματος}$  [1000  $\mu\text{L}$  / 50  $\mu\text{L}$ ].

Τιμή 70: Η πρωτεϊνική συγκέντρωση (70 mg/mL)

#### **2.4.2.η.iii. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH έγινε με βάση την μέθοδο των Reddy et al. (2004). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH βασίζεται στην οξείδωση της GSH που βρίσκεται στο αιμόλυμα από το DTNB. Η GSH του δείγματος αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ με βάση την παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 16), το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

Πιο αναλυτικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GSH, 20  $\mu\text{L}$  ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος προστίθενται σε 660  $\mu\text{L}$  67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 8) και 330  $\mu\text{L}$  διαλύματος DTNB 1 mM και. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min και στην συνέχεια ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm. Τα δείγματα χωρίς το ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.



**Εικόνα 27:** Οξειδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) με ταυτόχρονη μετατροπή του 5,5' δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DTNB. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/g Hb}) = [(\text{Abs}_{\text{sample}} - \Delta\text{A}_{\text{blank}} / 13,6) \times 262,6] \times 1000 / \text{Hb (g/L)}$$

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

Abs blank: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

$\epsilon_{412}\text{DTNB (mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$ : 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Τιμή 262,6: Ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 $\mu\text{L}$ ) προς τον όγκο του ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος (20 $\mu\text{L}$ ), πολλαπλασιασμένο με 2 λαμβάνοντας υπόψη την αρχική αραίωση με απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$

(1:1 v/v) κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και τέλος πολλαπλασιάζοντας με  $2 \times 1,3$  για να ληφθεί υπόψη η δεύτερη και τρίτη αραιώση με 5% TCA.

Τιμή 1000: Για τη μετατροπή mmol/L σε  $\mu\text{mol/mL}$

#### **2.4.2.η.ιν. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT**

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT στα δείγματα έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984). Η CAT είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε νερό και οξυγόνο (Halliwell, 2005). Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  απορροφά στα 240 nm. Παρουσία CAT στο δείγμα το  $\text{H}_2\text{O}_2$  μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο με αποτέλεσμα να μειώνεται η τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm.

Πιο αναλυτικά, 4  $\mu\text{L}$  ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος (αραιωμένο 1:10) προστίθενται σε 2991  $\mu\text{L}$  67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37°C. Πέντε  $\mu\text{L}$  από διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm (UV) για 130s. Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται από τη μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{CAT (U/mg Hb)} = (\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Hb (mg/mL)}$$

$\text{Abs}_{\text{sample per min}}$ : Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240}\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Τιμή 750: Ο συντελεστής αραιώσης ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L}$  ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος [3000  $\mu\text{L}$  / 4  $\mu\text{L}$ ]).

Τιμή 1000: Για τη μετατροπή mol/L σε  $\mu\text{mol/mL}$

Τιμή 10: Η αραιώση του δείγματος (1/10)

Τιμή 2: Η αραιώση με απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 v/v) κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων

#### 2.4.2.η.ν. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έγινε με βάση την μέθοδο των Janaszewska και Bartosz (2002). Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν δραστικά είδη. Είναι ένας δείκτης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των συστατικών του προς εξέταση δείγματος με την ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>). Η παρουσία ενός ατόμου υδρογόνου ανάγει τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> στην αντίστοιχη υδραζίνη. Η εξουδετέρωση της ρίζας εκτιμάται φωτομετρικά από τη μείωση της απορρόφησης στα 520 nm.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονται 20 μL πλάσματος, 480 μl 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4) και 500 μl διαλύματος 0.1 mM ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 20.000 g για 3 min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο τη ρίζα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4) αποτελούν το μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας αντιοξειδωτικής δράσης αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν 10 mM ασκορβικού οξέος, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) και 500 μL διαλύματος 0,1 mM ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TAC } (\mu\text{mol DPPH}^{\bullet} / \text{ml πλάσματος}) = [(\% \text{ Abs reduction} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$$

$$\% \text{ Abs reduction: } (\text{Abs blank} - \text{Abs sample}) / \text{Abs blank} \times 100$$

Τιμή 100: Για τη μετατροπή του ποσοστού μείωσης της απορρόφησης σε μείωση απορρόφησης

Τιμή 50: Η συγκέντρωση του DPPH στην κυβελίδα είναι 50 μmol/L

Τιμή 50: Ο συντελεστής αραιώσης ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L πλάσματος [1000 } \mu\text{L} / 20 \mu\text{L]}$ ).

Τιμή 1000: Για τη μετατροπή των L πλάσματος σε mL πλάσματος

### **2.4.3. 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).

Στις μετρήσεις του οξειδωτικού στρες, τα αιματολογικά και ανθρωπομετρικά δεδομένα, η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (θεραπεία; χρόνος) , two-way ANOVA, με επαναλαμβανόμενες συγκρίσεις στον χρόνο. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης απλής κύριας επίδρασης. Η απόδοση, ο βαθμός αντιληπτής άσκησης (RPE) και η οξείδωση του λίπους και των υδατανθράκων αναλύθηκαν με το Student's t test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

### **2.4.4. Αποτελέσματα**

#### **2.4.4.α. Αιματολογικές μετρήσεις**

Οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Όσον αφορά τον αιματοκρίτη, κύρια επίδραση του χρόνου και αλληλεπίδραση της χορήγησης του σκευάσματος και του χρόνου βρέθηκαν. Στην αιμοσφαιρίνη, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια βρέθηκαν κύριες επιδράσεις του χρόνου. Στο μέσο όγκο κυττάρων (MCV), τη μέση κυτταρική αιμοσφαιρίνη (MCH) και τη μέση συγκέντρωση κυτταρικής αιμοσφαιρίνης (MCHC) ούτε σημαντικές κύριες επιδράσεις ούτε αλληλεπιδράσεις βρέθηκαν.

**Πίνακας 6:** Οι αιματολογικές μεταβλητές των συμμετεχόντων της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου στις 8 χρονικές στιγμές του πειράματος (mean ± SEM).

<b>Experimental Groups</b>								
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
Hct <sup>a</sup> (%)	39,8±0,9	40,9±1,0*	39,5±0,9	39,1±1,1	41,8±0,8*	39,1±1,0	39,2±0,8	37,5±0,6**
Hb <sup>b</sup> (g·dL <sup>-1</sup> )	14,1±0,2	14,4±0,2	14,0±0,2	13,8±0,2	14,7±0,2*	13,8±0,2	13,8±0,2	13,3±0,2
RBC <sup>c</sup> (10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> )	5,1±0,1	5,3±0,1*	5,1±0,1	5,0±0,1	6,2±0,9	5,1±0,1	5,0±0,1	4,8±0,1
MCV <sup>d</sup> (fL)	77,6±2,0	77,8±2,0	77,8±2,0	77,7±2,0	77,7±1,9	77,4±2,1	77,9±1,6	78,0±1,7
MCH <sup>e</sup> (pg per cell)	27,4±0,6	27,4±0,6	27,4±0,6	27,4±0,5	27,3±0,5	27,3±0,7	27,4±0,6	27,3±0,5
MCHC <sup>f</sup> (g·dL <sup>-1</sup> )	35,5±0,6	35,4±0,6	35,3±0,5	35,3±0,6	35,2±0,5	35,4±0,5	35,3±0,4	35,6±0,4
WBC <sup>g</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	6,3±0,3	8,9±0,9	11,0±0,9*	10,0±0,6*	14,0±0,7*	9,2±0,5*	6,7±1,0	5,5±0,4
Plt <sup>h</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	249,6±18,4	294,9±20,9*	260,1±20,4	257,3±19,2	325,9±22,3*	266,7±21,6	232,9±14,9	229,1±18,0
<b>Placebo Groups</b>								
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
Hct <sup>a</sup> (%)	39,2±0,8	41,2±0,7	39,6±0,8	40,0±0,7	41,8±0,7*	39,8±0,8	40,0±0,5	40,0±0,5**
Hb <sup>b</sup> (g·dL <sup>-1</sup> )	13,9±0,3	14,5±0,3	13,9±0,3	13,0±1,1	14,6±0,3	14,0±0,2	13,9±0,2	13,5±0,2
RBC <sup>c</sup> (10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> )	5,0±0,1	5,3±0,1	5,1±0,1	5,1±0,1	5,3±0,1*	5,1±0,1	5,1±0,1	4,9±0,1
MCV <sup>d</sup> (fL)	77,8±2,0	78,1±1,2	77,9±1,2	77,9±1,1	78,2±1,2	78,3±1,2	78,0±1,3	77,8±1,4
MCH <sup>e</sup> (pg per cell)	27,6±0,5	27,5±0,5	27,4±0,5	27,4±0,4	27,3±0,5	27,5±0,5	27,1±0,5	27,3±0,5
MCHC <sup>f</sup> (g·dL <sup>-1</sup> )	35,4±0,5	35,2±0,5	35,2±0,5	34,6±0,9	34,9±0,4	35,2±0,5	34,8±0,5	35,1±0,5
WBC <sup>g</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	6,2±0,3	8,4±0,6	10,3±0,7*	9,9±0,6*	12,9±0,7*	8,6±0,4*	6,0±0,3	5,8±0,2
Plt <sup>h</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	232,1±12,2	279,1±13,4	238,8±13,7	251,9±14,7	302,9±15,1*	254,8±11,4	233,9±14,3	220,9±15,2

<sup>a</sup> Hct= αιματοκρίτης

<sup>b</sup> Hb= αιμοσφαιρίνη

<sup>c</sup> RBC= ερυθρά αιμοσφαίρια

<sup>d</sup> MCV= μέσος όγκος κυττάρων

<sup>e</sup> MCH= μέση κυτταρική αιμοσφαιρίνη

<sup>f</sup> MCHC= μέση συγκέντρωση κυτταρικής αιμοσφαιρίνης

<sup>g</sup> WBC= λευκά αιμοσφαίρια

<sup>h</sup> Plt= αιμοπετάλια

\*Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από την αρχική τιμή (T1) στην ίδια ομάδα (p<0.05)

\*\*Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από την αντίστοιχη τιμή μεταξύ των ομάδων (p<0.05)



#### **2.4.4.β. Απόδοση και RPE**

Η απόδοση ορίστηκε ως ο χρόνος ποδηλασίας στο 95% του  $VO_{2max}$  (time Trial) μέχρι εξαντλήσεως. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p > 0,05$ ). Οι συμμετέχοντες όταν έλαβαν το πειραματικό κέικ έφτασαν σε εξάντληση μετά από  $169.4 \pm 47.6$  s και όταν έλαβαν το εικονικό κέικ έφτασαν σε εξάντληση μετά από  $153.4 \pm 19.5$ s. Ο μέσος RPE για τις δύο ώρες άσκησης (πειραματική δοκιμή:  $12.4 \pm 0.48$ , εικονική δοκιμή:  $12.3 \pm 0.69$ ) και για τη μία ώρα άσκησης (πειραματική δοκιμή:  $14.3 \pm 0.40$ , εικονική δοκιμή:  $13.9 \pm 0.5$ ) δεν ήταν σημαντικά διαφορετικός μεταξύ των δύο καταστάσεων.

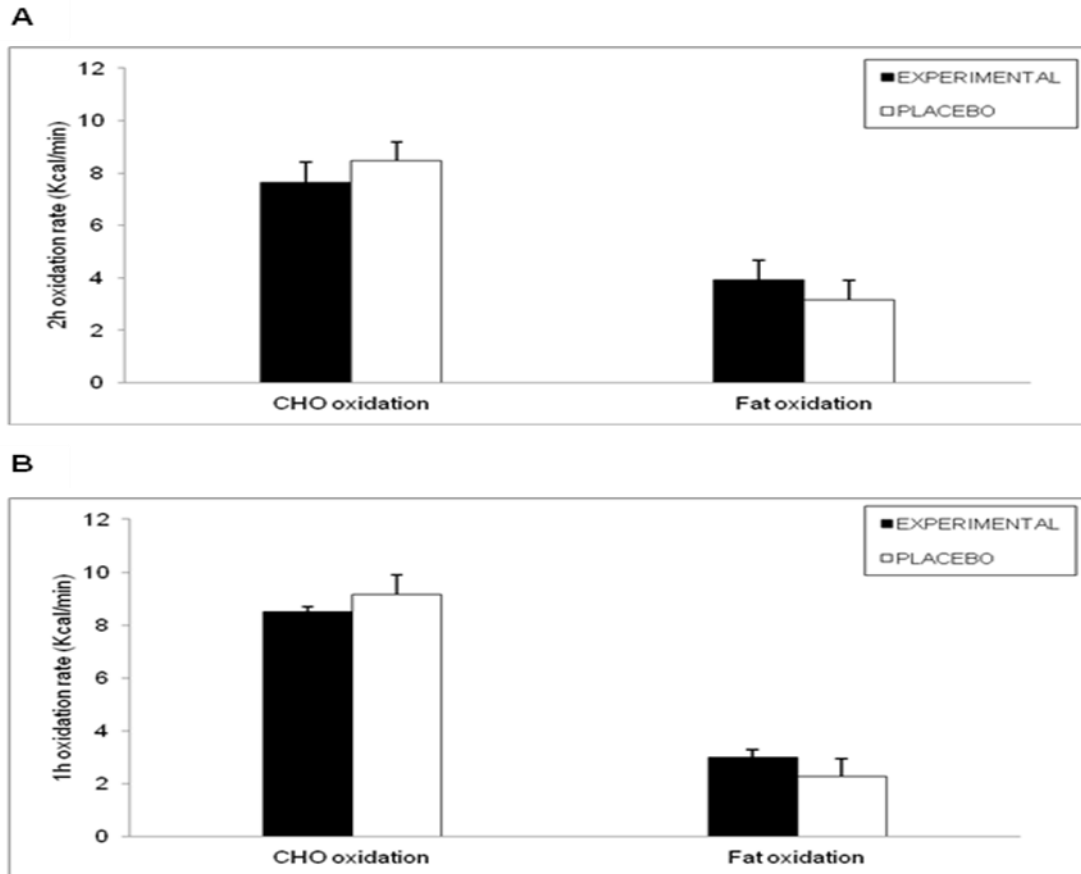
#### **2.4.4.γ.Οξειδωση λίπους και υδατανθράκων**

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην οξειδωση λίπους και υδατανθράκων κατά τη διάρκεια των δύο ωρών άσκησης (Γράφημα 31A) και κατά τη διάρκεια της μίας ώρας άσκησης μετά τη λήψη του κέικ (Γράφημα 31B).

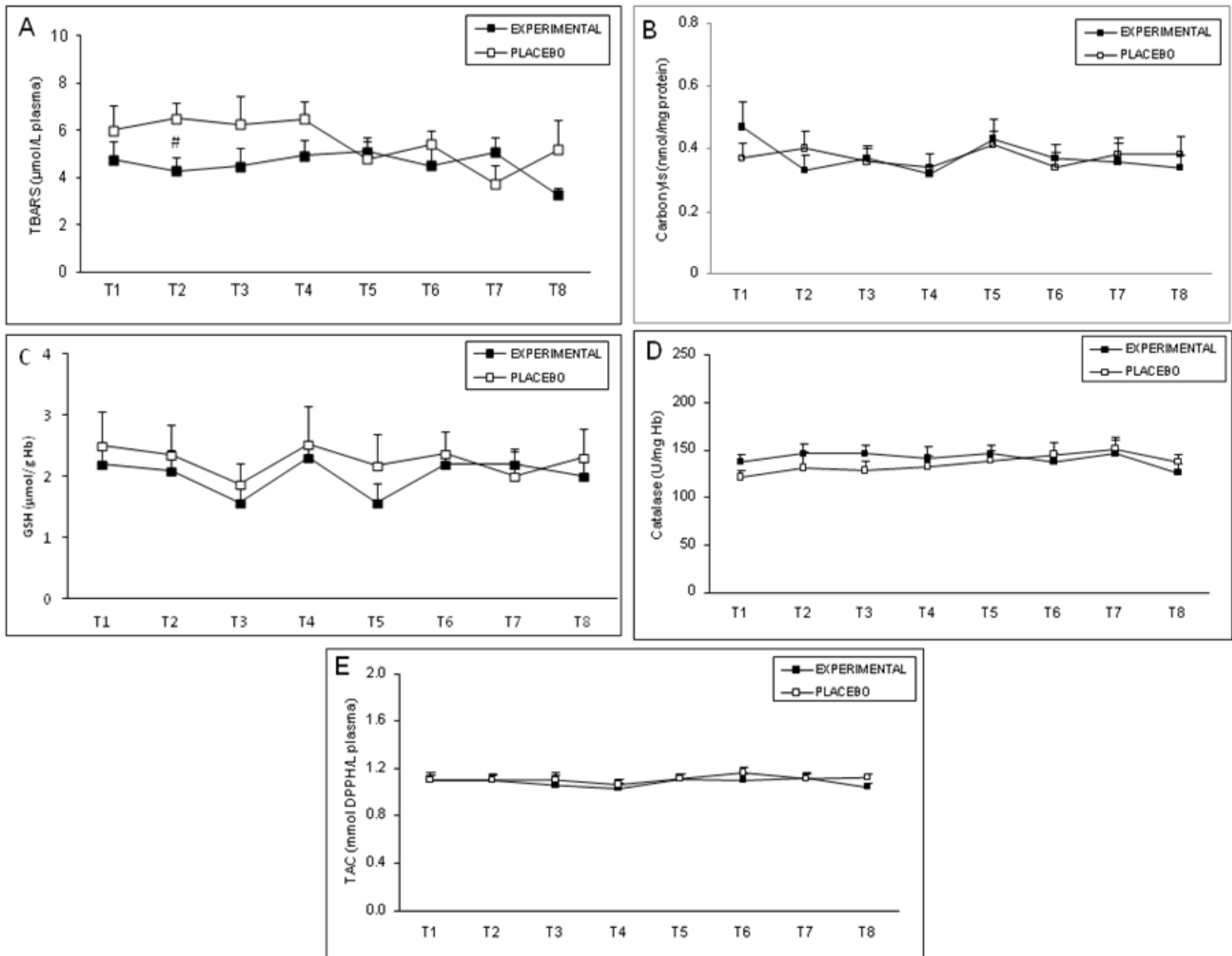
#### **2.4.4.δ. Δείκτες οξειδωτικού στρες**

Όσον αφορά το δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS βρέθηκε κύρια επίδραση της χορήγησης του σκευάσματος καθώς και αλληλεπίδραση της χορήγησης με τον χρόνο ( $p < 0.05$ ). Το εξεταζόμενο κέικ μείωσε σημαντικά ( $p < 0.05$ ) τα TBARS, 30 λεπτά μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά 34% (Γράφημα 32A). Συγκεκριμένα, οι τιμές για την ομάδα που κατανάλωσε το κέικ και για την ομάδα ελέγχου ήταν  $4,3 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/L}$  plasma και  $6,5 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/L}$  plasma αντίστοιχα. Τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές, 1,5 ώρα και 4 ώρες μετά την άσκηση, αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση, 1 ώρα, 24 ώρες και 48 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση, δεν υπήρχε καμία διαφορά. Τη χρονική στιγμή, 30 λεπτά μετά την άσκηση οι τιμές των υπολοίπων δεικτών στην ομάδα που έλαβε το κέικ και στην ομάδα ελέγχου ήταν οι εξής: πρωτεϊνικά καρβονύλια  $0,33 \pm 0,05$   $\text{nmol/mg}$  πρωτεΐνης και  $0,40 \pm 0,05$   $\text{nmol/mg}$  πρωτεΐνης αντίστοιχα, καταλάση  $146,7 \pm 9,3$   $\text{U/mg}$  Hb και  $131,3 \pm 15,8$   $\text{U/mg}$  Hb αντίστοιχα, γλουταθειόνη  $2,2 \pm 0,34$   $\mu\text{mol/g}$  Hb και  $2,4 \pm 0,48$   $\mu\text{mol/g}$  Hb αντίστοιχα, TAC  $1,105 \pm 0,04$   $\text{mmol DPPH/L}$  plasma και  $1,103 \pm 0,1$   $\text{mmol DPPH/L}$

πλασμα αντίστοιχα. Οι παρατηρούμενες διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, καθώς και στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (Γράφηματα 32B, 32C, 32D, 32E).



**Γράφημα 31:** Επίδραση της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στην οξείδωση του λίπους και των υδατανθράκων κατά τη διάρκεια των 2 ωρών άσκησης (A) και κατά τη διάρκεια της 1 ώρας άσκησης μετά τη λήψη του κέικ (B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.



**Γράφημα 32:** Οι επιδράσεις της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στις δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος του πλάσματος (TBARS) (A), στα πρωτεϊνικά καρβονύλια του πλάσματος (B), στη γλουταθειόνη (GSH) των ερυθροκυττάρων (C), στην καταλάση (CAT) των ερυθροκυττάρων (D) και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος (E). T1= πριν την άσκηση, T2= 30 λεπτά μετά την άσκηση, T3= 1.5 ώρα μετά την άσκηση, T4= 4 ώρες μετά την άσκηση, T5= αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση, T6= 1 ώρα μετά την εξαντλητική άσκηση, T7= 24 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση, T8= 48 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου την ίδια χρονική στιγμή ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

#### 2.4.5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση ενός κέικ που αποτελείται από υδατάνθρακες και πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε αναλογία 3.5:1, σε δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από ένα πρωτόκολλο άσκησης (ποδηλασία) μέχρι εξαντλήσεως. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν ήταν τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η GSH, η καταλάση και η TAC. Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι το πειραματικό κέικ μείωσε τα TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά 34%, 30 λεπτά μετά την άσκηση. Όσον αφορά τους υπόλοιπους δείκτες δεν υπήρχε κάποια διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε το εξεταζόμενο κέικ και της ομάδας ελέγχου. Ακόμη, δεν επηρεάστηκε η απόδοση της άσκησης όπως υπολογίστηκε από τον χρόνο μέχρι την εξάντληση μετά από ποδηλασία σε ένταση που αντιστοιχεί στο 95% του  $VO_{2max}$  των εθελοντών.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση υδατανθράκων ή μίγματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών δε μειώνει το επαγόμενο από άσκηση οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση υδατανθράκων σε αθλητές μετά από τρέξιμο 3 ωρών στο 70% του  $VO_{2max}$  δεν μείωσε την αύξηση του οξειδωτικού στρες όπως καθορίστηκε από τη μέτρηση των F2-ισοπροστανίων, των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (McAnulty et al., 2003). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν καθώς η εξαντλητική άσκηση αντοχής και η χορήγηση υδατανθράκων δεν επηρέασε το οξειδωτικό στρες (συγκέντρωση F2-ισοπροστανίων) ή την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σε προπονημένα άτομα (McAnulty et al., 2005). Οι Karolkiewicz et al. (2001) εξέτασαν την επίδραση ενός συμπληρώματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών στα επίπεδα της GSH και των TBARS σε αθλητές στίβου και δεν βρέθηκε κάποια επίδραση στα επίπεδα των δεικτών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι Vasankari et al. (1998) μελέτησαν 8 αθλητές που έτρεξαν 27 km σε δύο χωριστές καταστάσεις με τυχαία χορήγηση είτε ενός σκευάσματος υδατανθράκων είτε ενός σκευάσματος ελέγχου. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι δεν υπήρξε καμία επίδραση της χορήγησης των υδατανθράκων στα διένια του ορού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, ένα ρόφημα που περιείχε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και βιταμίνες δεν είχε καμία δράση στα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία του πλάσματος σε σύγκριση με ένα ισοθερμικό ρόφημα υδατανθράκων (Goldfarb et al., 2009).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία που εξετάζουν τις επιπτώσεις σκευασμάτων υδατανθράκων-πρωτεϊνών στην απόδοση της άσκησης και η πλειοψηφία αυτών έχει παρατηρήσει εργογόνα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη πρωτεΐνης σε ένα συμπλήρωμα υδατανθράκων αυξάνει την αερόβια απόδοση αντοχής σε ποδηλασία διαφορετικών εντάσεων (Ivy et al., 2003). Επιπλέον, ένα ρόφημα υδατανθράκων με επιπρόσθετες θερμίδες πρωτεΐνης οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του χρόνου μέχρι να επέλθει κόπωση και μείωση της μυϊκής βλάβης σε αθλητές ποδηλασίας αντοχής (Saunders et al., 2004, 2007) και ακόμη βελτίωση της ικανότητας για άσκηση παρατηρήθηκε μετά από τρέξιμο σε διάδρομο στο 70% του  $VO_{2max}$  (Betts et al., 2007). Οι Ferguson et al. (2010) παρατήρησαν ότι ένα μίγμα υδατανθράκων με μια μέτρια ποσότητα πρωτεΐνης μπορεί να βελτιώσει την αερόβια αντοχή σε άσκηση εντάσεως μεταξύ 45 και 70% του  $VO_{2max}$ . Οι Niles et al. (2001) έδειξαν ότι ένα ρόφημα υδατανθράκων-πρωτεϊνών βελτιώνει το χρόνο της εξάντλησης μετά από άσκηση αντοχής. Έχει προταθεί ότι η συμπερίληψη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης (συνήθως 20% των συνολικών θερμίδων) σε ένα ρόφημα υδατανθράκων μπορεί να προσφέρει περισσότερα οφέλη από τα παραδοσιακά ροφήματα που περιέχουν μόνο υδατάνθρακες (Ivy et al., 2002,2003).

Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα σκευάσματα υδατανθράκων-πρωτεϊνών δεν εμφανίζουν κάποια επίδραση στην απόδοση. Έχει δειχθεί ότι ένα ρόφημα υδατανθράκων-πρωτεϊνών δεν είχε κάποια επίδραση στην απόδοση μετά από ισοκινητική άσκηση ποδιού (Haff et al., 2000) και μετά από άσκηση αντοχής (Baty et al., 2007) σε σχέση με ένα ρόφημα που περιέχει μόνο υδατάνθρακες. Επιπρόσθετα, οι Betts et al. (2005) αποκάλυψαν ότι η προσθήκη πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα υδατανθράκων δεν είχε καμία επίδραση στον χρόνο μέχρι την εξάντληση στο 85% του  $VO_{2max}$ . Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τα οποία έδειξαν ότι ένα κέικ που περιέχει υδατάνθρακες και πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν βελτίωσε την απόδοση της άσκησης.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των ερευνών μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό τύπο άσκησης που χρησιμοποιείται, την διαφορετική πηγή πρωτεΐνης καθώς και το ποσό πρωτεΐνης που προστίθεται στο σκεύασμα των υδατανθράκων.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αναφέρεται ως μια βιοδραστική ένωση. Το αμινοξικό προφίλ της την καθιστά ιδανική για τη βελτίωση της σύστασης του σώματος, τη μείωση του σωματικού λίπους και τη

μυϊκή ανάπτυξη. Άλλα βιοδραστικά συστατικά του ορού γάλακτος θα μπορούσαν να βελτιώσουν επιπλέον πτυχές της υγείας δραστήριων ατόμων και αθλητών με τη βελτίωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού και της υγείας του γαστρεντερικού καθώς και την εμφάνιση αντι-φλεγμονώδους δράσης. Επίσης είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος περιέχει υψηλά ποσά του αμινοξέος κυστεΐνης. Αυτό κατά πάσα πιθανότητα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα GSH που το κύτταρο προτιμάει ως πηγή αντιοξειδωτικών (Elia et al., 2006). Αυτό είναι μια πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη λιπιδική υπεροξειδωση που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη στην ομάδα που χορηγήθηκε το σκεύασμα υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς το κύτταρο έχει υψηλότερα επίπεδα GSH και προστατεύει άλλα μακρομόρια.

Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι ένα κέικ που αποτελείται από συγκεκριμένη αναλογία υδατανθράκων-πρωτεΐνης ορού γάλακτος μείωσε τη λιπιδική υπεροξειδωση σε αθλητές μετά από άσκηση. Είναι η πρώτη μελέτη στην οποία χορηγείται σκεύασμα υπό μορφή κέικ καθώς προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιούσαν κυρίως υγρά σκευάσματα.

## **2.5.Επίδραση σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες φλεγμονής μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους**

### **2.5.1. Γενικά**

Η έκκεντρη άσκηση προκαλεί μεγάλη μυϊκή βλάβη, η οποία οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση. Ο τύπος άσκησης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η ποδηλασία, που ανήκει στην κατηγορία των αερόβιων ασκήσεων. Η έντονη αερόβια άσκηση προκαλεί μικρή μυϊκή βλάβη και έχει προταθεί ως ένα μοντέλο σωματικού στρες (η δύναμη που εφαρμόζεται σε μια δεδομένη περιοχή ενός βιολογικού ιστού) (Pedersen, 2000). Η έντονη άσκηση επηρεάζει τις αποκρίσεις των κυτοκινών μέσω των αλλαγών στη συστηματική κυκλοφορία και των ορμονών που εκκρίνονται σε απόκριση στο σωματικό στρες. Έτσι, ένας αριθμός προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών αυξάνεται μετά από έντονη άσκηση. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της IL-1a, του TNF-a, της IL-10, της IL-8 και της IL-6 αυξάνονται σε απόκριση στην άσκηση (Febbraio and Pedersen, 2002, 2005; Gleeson and Bishop, 2005; Pedersen et al., 2004; Petersen and Pedersen, 2005). Προς το τέλος του καταρράκτη της φλεγμονώδους αντίδρασης, η CRP, μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, επάγεται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες και κυρίως από την IL-6. Το μέγεθος της

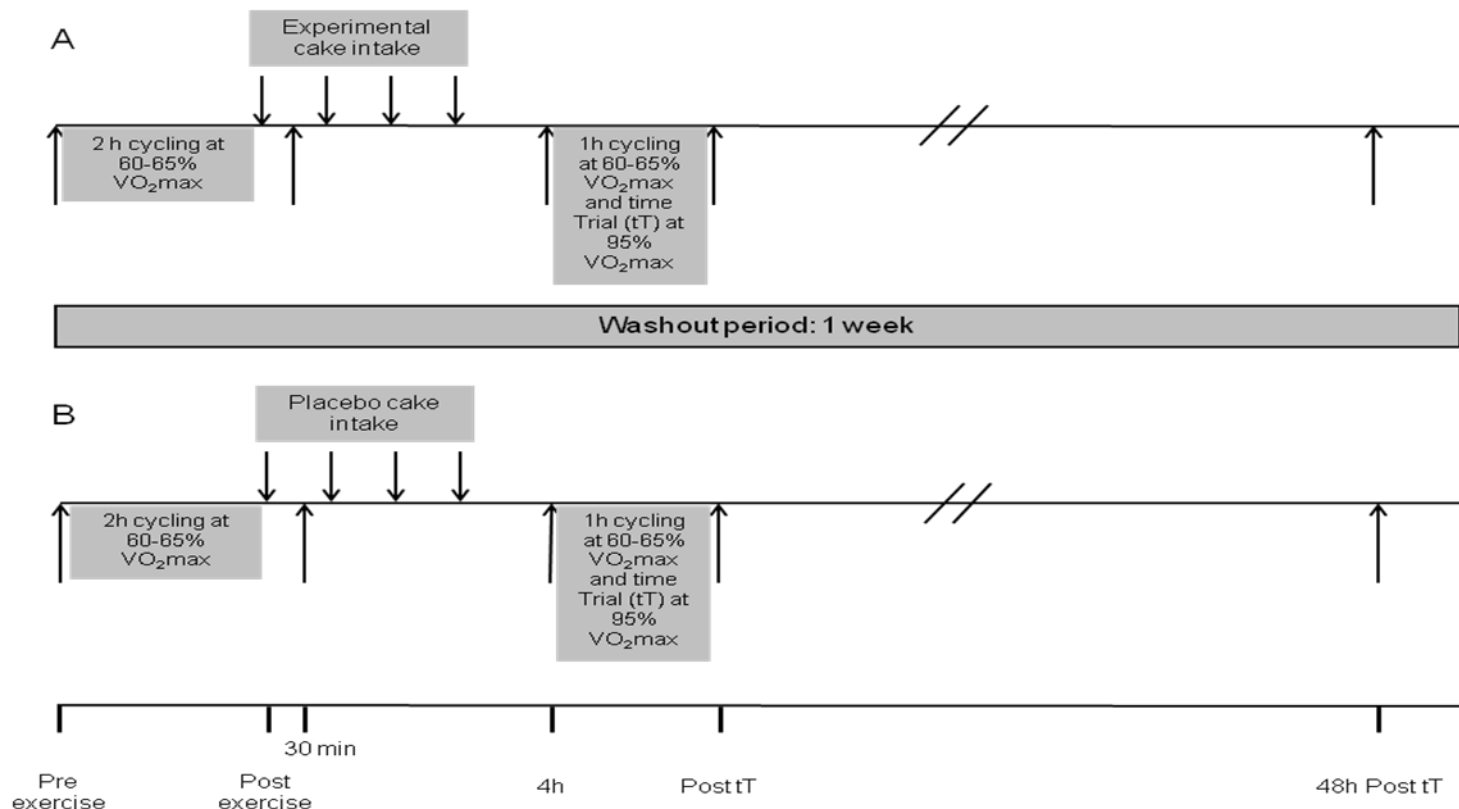
φλεγμονώδους απόκρισης εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης. Αν η φλεγμονή γίνει χρόνια, τότε μεγάλη και ανεπανόρθωτη βλάβη μπορεί να συμβεί στους ιστούς (Calder et al., 2009). Για να αποφευχθούν αυτές οι επιβλαβείς επιδράσεις πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να καταστείλουν τη φλεγμονή μέσω χορήγησης σκευασμάτων υδατανθράκων ή συνδυασμού υδατανθράκων-πρωτεϊνών (Afroundeh et al., 2010; Miles et al., 2007; Robson-Ansley et al., 2011; Rowlands et al., 2008; Starkie et al., 2000, 2001).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει τις επιπτώσεις ενός κέικ υδατανθράκων-πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε δείκτες φλεγμονής σε αθλητές μετά από άσκηση. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι IL-6 και η IL-10 με την ποσοτική μέθοδο ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) και η CRP με τη ανοσοθολοσιμετρική ανάλυση.

## **2.5.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.5.2.α. Συμμετέχοντες**

Ταυτόχρονα με τον προσδιορισμό των δεικτών του οξειδωτικού στρες, στους συμμετέχοντες πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός δεικτών φλεγμονής όπως οι κυτοκίνες IL-6 και IL-10 με ποσοτική μέθοδο ενζυμικού προσδιορισμού (ELISA) και η CRP με ανοσοθολοσιμετρική ανάλυση. Ο προσδιορισμός των δεικτών πραγματοποιήθηκε πριν την άσκηση (T1), 30 λεπτά μετά την άσκηση (T2), 4 ώρες μετά την άσκηση (T3), αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση (T4) και 48 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση (T5).



**Εικόνα 28:** Πειραματικός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου άσκησης. Τα βέλη προς τα κάτω δείχνουν τη χρονική στιγμή λήψης του πειραματικού (A) ή του εικονικού (B) κέικ. Τα βέλη προς τα πάνω δείχνουν τη χρονική στιγμή αιμοληψίας.

### 2.5.2.β. Αντιδραστήρια

Τα κιτ ποσοτικού ενζυμικού προσδιορισμού της IL-6 και της IL-10 αποκτήθηκαν από την εταιρεία R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).

### 2.5.2.γ. Μέθοδοι

#### 2.5.2.γ.ι. Προσδιορισμός της IL-6 του πλάσματος με τη μέθοδο της ELISA

Για τον προσδιορισμό της IL-6, μια τεχνική “σάντουιτς” ποσοτικού ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε. Πιο αναλυτικά, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-6 προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι. Στη συνέχεια, 100 μl του προτύπου ή του δείγματος προστίθενται ανά πηγαδάκι και ακολουθεί επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση στις  $500 \pm 50$  στροφές. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί απομάκρυνση του περιεχομένου των πηγαδιών και πλύση με 400 μl washing buffer. Η διαδικασία της πλύσης πραγματοποιείται 6 φορές. Έπειτα προστίθενται 200 μl ενός ένζυμο-συνδεδεμένου πολυκλωνικού αντισώματος ειδικό για την IL-6 ανά πηγαδάκι και τα δείγματα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία



δωματίου σε αναδευτήρα. Ακολουθεί απομάκρυνση του περιεχομένου των πηγαδιών και 6 πλύσεις με 400 μl washing buffer. Προστίθενται 50 μl διαλύματος υποστρώματος ανά πηγαδάκι και επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl ενός διαλύματος που ξεκινάει την ανάπτυξη χρώματος και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μετά την προσθήκη 50 μl διαλύματος που σταματάει την ανάπτυξη του χρώματος, η ένταση του χρώματος μετράται στα 490 nm και επίσης στα 650 nm ως μήκος κύματος αναφοράς. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση (MDD) για την IL-6 είναι 0.039 pg/mL.

#### **2.5.2.γ.ii. Προσδιορισμός της IL-10 του πλάσματος με τη μέθοδο της ELISA**

Για τον προσδιορισμό της IL-10, μια τεχνική “σάντουιτς” ποσοτικού ένζυμικού ανοσοπροσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε. Πιο αναλυτικά, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-10 προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι. Στη συνέχεια, 200 μl του προτύπου ή του δείγματος προστίθενται ανά πηγαδάκι και ακολούθησε επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση στις  $500 \pm 50$  στροφές. Μετα το πέρας της επώασης, ακολουθεί απομάκρυνση του περιεχομένου των πηγαδιών και πλύση με 400 μl washing buffer. Η διαδικασία της πλύσης πραγματοποιήθηκε 6 φορές. Έπειτα προστίθενται 200 μl ενός ένζυμο-συνδεδεμένου πολυκλωνικού αντισώματος ειδικό για την IL-10 ανά πηγαδάκι και τα δείγματα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα. Ακολουθεί απομάκρυνση του περιεχομένου των πηγαδιών και 6 πλύσεις με 400μl washing buffer. Προστίθενται 50 μl διαλύματος υποστρώματος ανά πηγαδάκι και επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl ενός διαλύματος που ξεκινάει την ανάπτυξη χρώματος και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα. Τέλος, μετά την προσθήκη 50 μl διαλύματος που σταματάει την ανάπτυξη του χρώματος, η ένταση του χρώματος μετράται στα 490 nm και επίσης στα 650 nm ως μήκος κύματος αναφοράς. Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση (MDD) για την IL-6 είναι 0.09 pg/mL.

#### **2.5.2.γ.iii. Προσδιορισμός της CRP του πλάσματος με ανοσοθολοσιμετρική ανάλυση**

Η ανοσοθολοσιμετρική ανίχνευση της CRP πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Olympus AU2700 (Rungis France). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης

για τη CRP ήταν 1.57 mg/L. Η αντίχνευση ήταν γραμμική για ένα εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 5-300 mg/L.

### **2.5.3. Στατιστική ανάλυση**

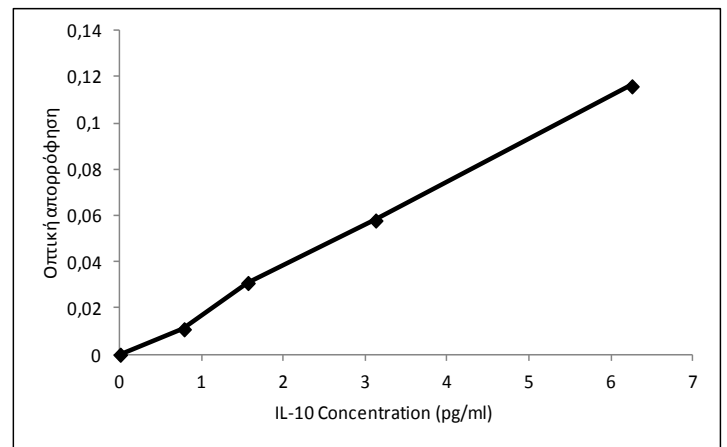
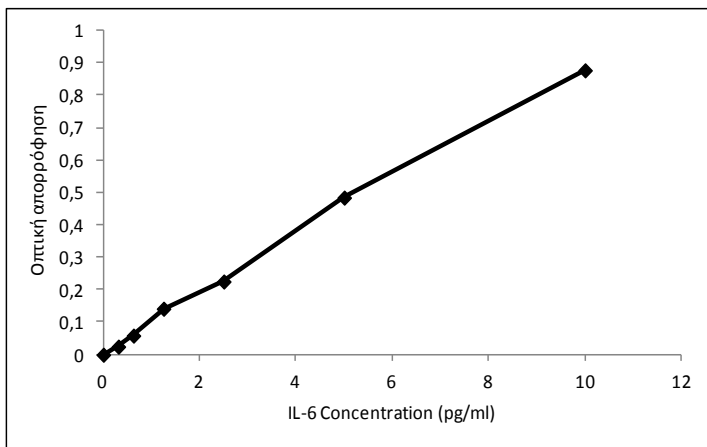
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard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

Στις μετρήσεις των δεικτών φλεγμονής, η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (θεραπεία; χρόνος), two-way ANOVA, με επαναλαμβανόμενες συγκρίσεις στον χρόνο. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης απλής κύριας επίδρασης. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0.05$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

### **2.5.4. Αποτελέσματα**

#### **2.5.4.α. Πρότυπη καμπύλη IL-6 και IL-10**

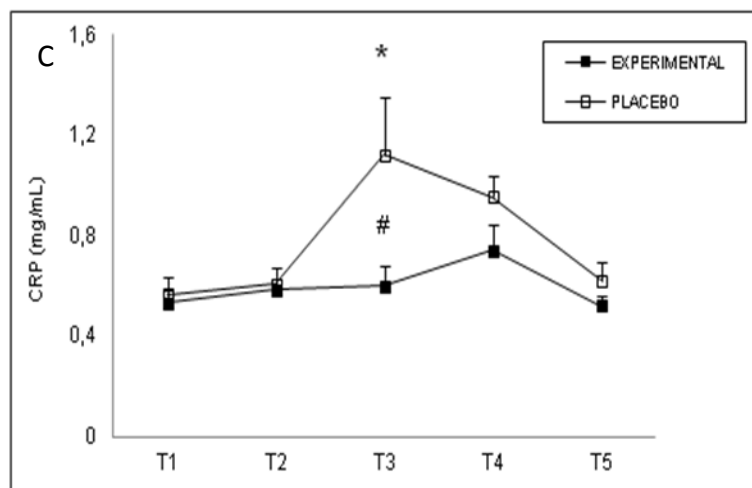
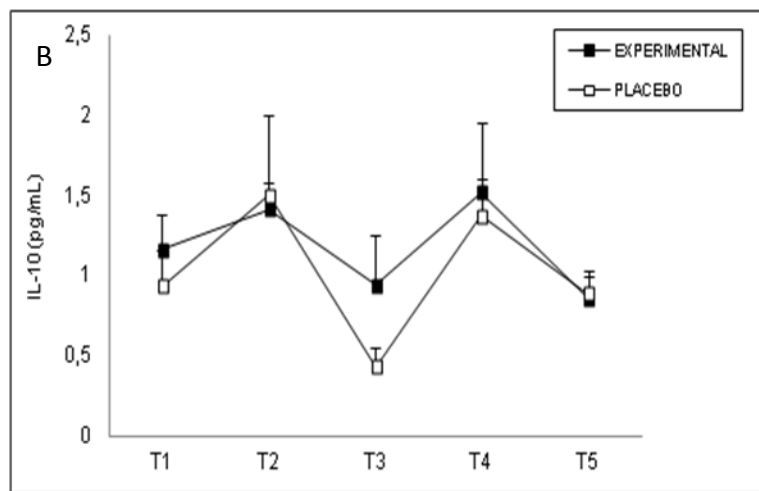
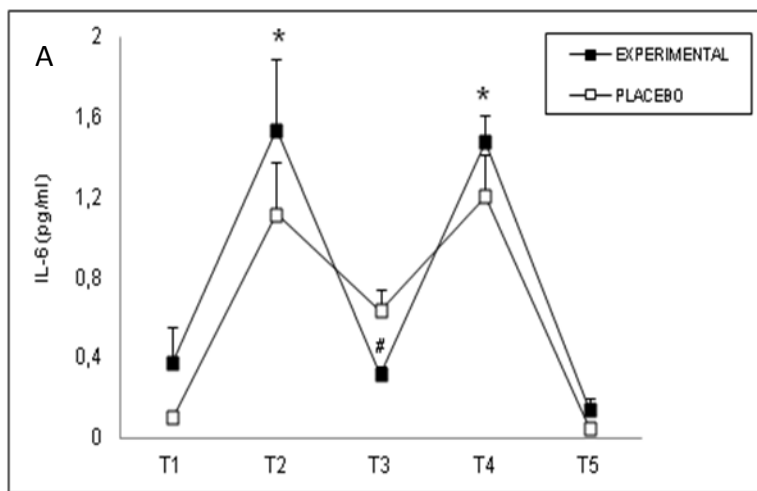
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-6 και της IL-10 στα δείγματα, κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη τόσο για την IL-6 και IL-10 (Γράφημα 33). Αυξανόμενες συγκεντρώσεις προτύπου για την IL-6 (0.312-10 pg/mL) και για την IL-10 (0.78-6.25 pg/mL) φωτομετρήθηκαν στα 490 nm και στα 650 nm ως μήκος κύματος αναφοράς.



**Γράφημα 33:** Πρότυπη καμπύλη της IL-6 (A) και της IL-10 (B).

#### 2.5.4.β. Δείκτες φλεγμονής

Όσον αφορά την κυτοκίνη IL-6, βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της χορήγησης του σκευάσματος ( $p < 0.05$ ). Ειδικότερα, υπήρχε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της IL-6, 30 min μετά την άσκηση (T2) και αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση (T4) σε σύγκριση με τη χρονική στιγμή πριν την άσκηση (T1) (Γράφημα 34A). Επιπλέον, η χορήγηση του πειραματικού κέικ προκάλεσε σημαντική μείωση ( $p < 0.05$ ) των επιπέδων της IL-6, 4 h μετά την άσκηση (T3), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά 50% (Γράφημα 34A). Αντιθέτως, στην IL-10 δεν παρατηρήθηκε σημαντική κύρια επίδραση του χρόνου ή της χορήγησης του σκευάσματος (Γράφημα 34B). Ωστόσο, τα επίπεδα της IL-10 του πλάσματος, 4 h μετά την άσκηση, ήταν αυξημένα στην ομάδα που έλαβε το πειραματικό σκεύασμα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Γράφημα 34B). Στην CRP του πλάσματος, βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της χορήγησης του σκευάσματος ( $p < 0.05$ ) (Γράφημα 34C). Συγκεκριμένα, υπήρχε σημαντική αύξηση ( $p < 0.05$ ) στα επίπεδα της CRP 4 h μετά την άσκηση (T3) σε σχέση με τη χρονική στιγμή πριν την άσκηση (T1). Επιπλέον, παράλληλα με την IL-6, τα επίπεδα της CRP στα άτομα που έλαβαν το πειραματικό κέικ ήταν μειωμένο κατά 46%, 4 h μετά την άσκηση (T3), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 34C).



**Γράφημα 34:** Οι επιδράσεις της χορήγησης του πειραματικού και του εικονικού κέικ στην (A) ιντερλευκίνη (IL)-6 του πλάσματος, στην (B) ιντερλευκίνη (IL)-10 του πλάσματος και (C) στην C- αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) του πλάσματος. T1=πριν την άσκηση, T2=30 λεπτά μετά την άσκηση, T3= 4 ώρες μετά την άσκηση, T4= αμέσως μετά την εξαντλητική άσκηση, T5= 48 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου την ίδια χρονική στιγμή ( $p < 0.05$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη χρονική στιγμή πριν την άσκηση (T1) ( $p < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  S

### 2.5.5. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνησει τις επιδράσεις ενός κέικ που περιέχει υδατάνθρακες και πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε συγκεκριμένη αναλογία (3.5:1) σε δείκτες φλεγμονής μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους. Συγκεκριμένα, οι φλεγμονώδεις δείκτες IL-6, IL-10 και CRP μετρήθηκαν στο πλάσμα των συμμετεχόντων. Η IL-6 παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα (έως και 100 φορές) από οποιαδήποτε άλλη κυτοκίνη σε απόκριση στην άσκηση (Fischer, 2006). Κατά τη διάρκεια σωματικής άσκησης, η IL-6 παράγεται κατά κύριο λόγο στους σκελετικούς μύες που εμπλέκονται στην άσκηση (Jonsdottir et al., 2000; Starkie et al., 2001; Wood et al., 2009) και στη συνέχεια απελευθερώνεται στην κυκλοφορία (Pedersen & Edward, 2009; Steensberg et al., 2000). Το μέγεθος της απόκρισης της IL-6 στην άσκηση εξαρτάται από την ένταση και ιδιαίτερα από τη διάρκεια της, ενώ ο τύπος της άσκησης έχει μικρό αντίκτυπο. Η IL-6 έχει ταξινομηθεί τόσο ως αντιφλεγμονώδης όσο και ως προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη (Gleeson et al., 2011). Ασκεί τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά στο τέλος της εμφανίζει προ-φλεγμονώδη δράση με συμμετοχή στην παραγωγή της απόκρισης οξείας φάσης και των τοπικών και συστηματικών γεγονότων που συνοδεύουν την τοπική φλεγμονώδη απόκριση (Mastorakos et al., 2005). Η IL-10 δρα κατασταλτικά μειώνοντας ή αναστέλλοντας εντελώς την έκφραση αρκετών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων διαλυτών μεσολαβητών και έτσι διακυβεύεται ακόμη περισσότερο η ικανότητα των T κυττάρων να διατηρούν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Maynard & Weaver, 2008; Moore et al., 2001). Έτσι, η IL-10 είναι ένας ισχυρός υποκινητής μιας αντιφλεγμονώδους κατάστασης. Η CRP είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, η οποία αντανακλά ένα μέτρο της απόκρισης οξείας φάσης. Η IL-6 και άλλες κυτοκίνες ενεργοποιούν τη σύνθεση της CRP στο ήπαρ.

Το βασικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι η κατανάλωση του πειραματικού κέικ μείωσε τη φλεγμονώδη απόκριση μετά την άσκηση. Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με την πλειοψηφία προηγούμενων μελετών, οι οποίες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση υδατανθράκων μείωσε την αύξηση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ιδιαίτερα της IL-6. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση 1 kg υδατανθράκων ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ώρα εξασθενεί την απόκριση

της IL-6 σε παρατεταμένη άσκηση αντοχής (Nieman et al., 2003, 2005). Οι Scharhag et al. (2006) έδειξαν ότι συμπλήρωμα υδατανθράκων μείωσε σημαντικά την ολική IL-6 του πλάσματος μετά από ποδηλασία για 4 ώρες σε ανθρώπους. Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση υδατανθράκων μείωσε την αύξηση της IL-6 του πλάσματος κατά τη διάρκεια τόσο ποδηλασίας όσο και τρεξίματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Nieman et al., 2003). Ακόμη, οι Robson-Ansley et al. (2011), που μελέτησαν τις επιδράσεις χορήγησης υδατανθράκων σε 7 προπονημένους δρομείς, ανέφεραν ότι η λήψη υδατανθράκων μείωσε την απόκριση της IL-6 στην άσκηση. Επίσης, τα αποτελέσματα από μια μελέτη που συμμετείχαν 7 μετρίως προπονημένοι άντρες που εκτελούσαν τόσο τρέξιμο όσο και ποδηλασία, έδειξαν ότι η χορήγηση υδατανθράκων μείωσε την αύξηση της IL-6 (Starkie et al., 2001).

Σχετικά με την αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη IL-10, τα επίπεδα της ήταν αυξημένα κατά 118% στις 4 ώρες μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά. Ωστόσο, σε προηγούμενη μελέτη, μετά από 2 ώρες έντονης άσκησης αντιστάσεων δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα της IL-10 του πλάσματος μεταξύ της ομάδας που έλαβε υδατάνθρακες και στην ομάδα ελέγχου (Nieman et al., 2003).

Η CRP είναι μια φλεγμονώδης πρωτεΐνη που παράγεται από το ήπαρ σε απόκριση στις αυξήσεις των επιπέδων της IL-6 και άλλων φλεγμονωδών τωνολαβητών (Edward, 2005). Αύξηση στα επίπεδα της CRP δείχνουν ότι η IL-6 που παράγεται σε επίπεδο ιστού ενεργοποιεί μια οξειάς φάσης, συστηματική φλεγμονώδη απόκριση. Έτσι, τα μειωμένα επίπεδα της CRP κατά 46%, 4 ώρες μετά την άσκηση, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη αποδίδονται στα μειωμένα επίπεδα της IL-6 την ίδια χρονική στιγμή. Ωστόσο, οι Henson et al. (2000) έδειξαν ότι μετά από 2 ώρες κωπηλασία δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα της CRP μεταξύ της ομάδας που έλαβε τους υδατάνθρακες και της ομάδας ελέγχου. Ομοίως, σε μια άλλη μελέτη, μετά από έκκεντρη άσκηση δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε τους υδατάνθρακες και της ομάδας ελέγχου (Afroundeh et al., 2010).

Οι διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ της παρούσας μελέτης και προηγούμενων μελετών μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό τύπο άσκησης και στην πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στα σκευάσματα.

Στην βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που να εξετάζουν τις επιδράσεις σκευασμάτων υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες φλεγμονής. Οι

Cosio-Lima et al. (2012) έδειξαν ότι ένα ρόφημα υδατανθράκων-πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια μεγάλων περιόδων ποδηλασίας δεν μείωσε σε μεγάλο βαθμό τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε σχέση με ένα σκεύασμα υδατανθράκων. Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη, οι επιδράσεις ενός σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες φλεγμονής σε 12 ποδηλάτες ήταν ασήμαντες (Rowlands et al., 2008). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα δικά μας που έδειξαν ότι η κατανάλωση ενός σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεΐνης ορού γάλακτος υπό μορφή κέικ οδήγησε σε εξασθενημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών μετά από εξαντλητική ποδηλασία. Δεδομένου ότι και στις παραπάνω μελέτες η πηγή πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν επίσης πρωτεΐνη ορού γάλακτος και ένας παρόμοιος τύπος άσκησης χρησιμοποιήθηκε, οι διαφορές στα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην ειδική σύνθεση από πεπτίδια της δικής μας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και στο γεγονός ότι το σκεύασμα μας ήταν υπό μορφή κέικ ενώ οι άλλες μελέτες χρησιμοποιούσαν υγρά σκευάσματα.

Η χορήγηση υδατανθράκων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης άσκησης αντοχής έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και μικρότερες αποκρίσεις κορτιζόλης, επινεφρίνης και αυξητικών ορμονών (Murray et al., 1991). Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, λόγω των χαμηλών επιπέδων γλυκόζης, ο άξονας HPA ενεργοποιείται οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και επινεφρίνης που εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Ο οργανισμός με σκοπό να εξισσοροπήσει την αντιφλεγμονώδη δράση παράγει προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη σχέση μεταξύ των ορμονών του στρες και της παραγωγής κυτοκινών, είναι πιθανό ότι η χορήγηση υδατανθράκων θα διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος σε υψηλά επίπεδα και έτσι θα μετριάζει την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης και της επινεφρίνης και των προ- και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Η συμβολή της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην αντιφλεγμονώδη δράση του σκευάσματος πιθανώς να οφείλεται σε κάποια από τα συστατικά της. Είναι ενδιαφέρον ότι σε μια μελέτη σε επίμυες, η λακτοφερρίνη εμφάνισε αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μειώνοντας τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  και αυξάνοντας τα επίπεδα της IL-10 (Kobayashi et al., 2011).

Επιπλέον, ο αυξημένος σχηματισμός ROS κατά την άσκηση μπορεί να ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη σύνθεση της IL-6 (Fischer, 2006). Έτσι, η αντιφλεγμονώδης δράση του κέικ μπορεί να αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές του δράσεις (Kerasioti et al., 2012).

Εν κατακλειδι, το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι ένα κέικ που αποτελείται από συγκεκριμένη αναλογία υδατανθράκων-πρωτεϊνών ορού γάλακτος επιδεικνύει αντιφλεγμονώδη δράση, δεδομένου ότι μειώθηκαν οι προ-φλεγμονώδεις δείκτες IL-6 και CRP ενώ υπήρχε μια τάση αύξησης του αντι-φλεγμονώδους δείκτη IL-10 μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους.

---



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

---

### **ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται μία σημαντική αιτία οξειδωτικού στρες, που μπορεί να οδηγήσει σε θραύση του κλώνου του DNA, σε γονιδιακή μετάλλαξη και σε διασταυρόμενες συνδέσεις μεταξύ DNA-DNA και DNA-πρωτεΐνης, καθώς και σε βλάβες στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστό ότι είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού. Όταν το οξυγόνο παρέχεται σε περίσσεια ή η μείωση του είναι ανεπαρκής, τότε οδηγούμαστε σε παραγωγή ROS όπως ανιόντα σουπεροξειδίου, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Aruoma, 1999). Οι ROS εμπλέκονται σε ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού όπως η φαγοκύττωση, η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ενδοκυτταρική σηματοδότηση και η σύνθεση βιολογικά δραστικών ενώσεων (Halliwell and Gutteridge, 1989; Miquel and Romano-Bosca, 2004). Οι ROS έχουν εμπλακεί σε πολλές ασθένειες όπως η καρκινογένεση, η ελονοσία, οι καρδιακές παθήσεις, η αρτηριοσκλήρωση, ο διαβήτης και σε πολλά άλλα προβλήματα υγείας που σχετίζονται με τη γήρανση (Duh, 1998; Honda et al., 2004; Tanizawa, et al., 1992; Uchida, 2000). Η άσκηση, ιδιαίτερα η αερόβια, μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών, λόγω της αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου, το οποίο συνδέεται με μυϊκή βλάβη (Nikolaidis et al., 2007) και κόπωση (Betters et al., 2004). Ως εκ τούτου η αποκατάσταση των αθλητών μετά από σοβαρή άσκηση είναι αργή και η αθλητική απόδοση δεν είναι η βέλτιστη.

Ο ρόλος των ROS στην αιτιολογία και εξέλιξη επιβλαβών κλινικών καταστάσεων έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι επωφελή ως προφυλακτικοί παράγοντες. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχουν αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας που προστατεύουν από οξειδωτική βλάβη και επιδιορθώνουν τα κατεστραμμένα μόρια. Ωστόσο, οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ανεπαρκείς και η παροχή αντιοξειδωτικών μέσω διατροφικών συστατικών παρουσιάζει μεγάλο

ενδιαφέρον. Η ζήτηση για φυσικά αντιοξειδωτικά έχει πρόσφατα αυξηθεί λόγω των αμφιβολιών για την μακροπρόθεσμη ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Yu et al., 2002). Πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, όπως τα τρόφιμα. Υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως αμινοξέα και πρωτεΐνες, έχουν αναφερθεί λόγω των χηλικοδεσμευτικών ιδιοτήτων τους (Lu & Baker, 1986).

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αποτελεί το σύνολο των πρωτεϊνών που παραμένουν στην υγρή φάση κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού μετά την καθίζηση της καζεΐνης του γάλακτος και χαρακτηρίζεται ως ένα βιολειτουργικό τρόφιμο. Τα εκχυλίσματα της πρωτεΐνης που προέρχεται από τον ορό γάλακτος αποτελούν δημοφιλή συμπληρώματα στο χώρο της αθλητικής διατροφής. Τα εκχυλίσματα αυτά αποτελούν πρωτεϊνικά συμπληρώματα υψηλής βιολογικής αξίας και ενισχύουν τη σωματική απόδοση (Bartfay et al., 2003; Swain et al., 2002; Micke et al., 2001; Lands et al., 1999; Markus et al., 2002; Dragan et al., 1992). Περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας όπως λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη. Αυτά τα αμινοξέα και ιδιαίτερα η λευκίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών και είναι σημαντικοί παράγοντες στη μυϊκή υπερτροφία (Ha & Zemel, 2003) και δύναμη, στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση του ιστού (Anthony et al., 2001).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι βιολογικές επιδράσεις και ιδιαίτερα η αντιοξειδωτική δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος *in vivo* και *in vitro*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα εξής:

1. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και η αναγωγική δύναμη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος καθώς και η σύγκριση της με πρωτεϊνικά σκευάσματα του εμπορίου.
2. Η προστατευτική δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος απέναντι σε επαγόμενο οξειδωτικό στρες, από τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP, στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.
3. Ο προσδιορισμός του μοριακού μονοπατιού μέσω του οποίου η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί τις ευεργετικές τις επιδράσεις. Εξετάστηκε η επίδραση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και σε έναν αριθμός επαγόμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II.

4. Η επίδραση ενός σκευάσματος υδατανθράκων – αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος (σε αναλογία 3.5:1) υπό μορφή κέικ σε δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και της αναγωγικής δύναμης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος καθώς και της σύγκρισης της με πρωτεϊνικά σκευάσματα του εμπορίου είναι τα εξής:

i. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στις ρίζες DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> και OH<sup>•</sup> με τιμές IC<sub>50</sub> να κυμαίνονται από 1.8-4.1 mg πρωτεΐνης/ml.

ii. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος δεν εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το χαμηλό ρυθμό αντίδρασης αυτής της ρίζας με αμινοξέα καθώς και από τον μικρό χρόνο ημιζωής της (Halliwell & Gutteridge, 1999).

iii. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις εμφάνισε αυξημένη αναγωγική δύναμη (RP<sub>0.5AU</sub>=1.3 mg πρωτεΐνης/ml).

iv. Η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και η αναγωγική δύναμη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος μπορεί να οφείλεται στο αυξημένο περιεχόμενο της σε κυστεΐνη που οδηγεί σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH. Η GSH λειτουργεί ως δότης υδρογόνου σε ένα μεγάλο αριθμό ριζών (Yu, 1994). Ακόμη, η ικανότητα εξουδετέρωσης μπορεί να οφείλεται σε κάποια από τα συστατικά της. Για παράδειγμα, η α-λακταλβουμίνη μπορεί να δεσμεύει χηλικά βαριά μέταλλα οδηγώντας σε μείωση του οξειδωτικού στρες λόγω των σίδηρο-δεσμευτικών ιδιοτήτων της.

Η μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στο επαγόμενο από τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP- οξειδωτικό στρες, στις κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy926 έδειξε ότι:

i. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (δείκτης

πρωτεϊνικής οξειδωσης) και των ROS τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Η ομάδαθειόλης της κυστεΐνης της GSH λειτουργεί ως δότης ατόμου υδρογόνου σε άλλα ασταθή μόρια όπως ελεύθερες ρίζες και ROS με αποτέλεσμα την εξουδετέρωσή τους. Ακόμη, τα παραπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν σε πρωτεϊνική οξειδωση (Kim et al., 1997; Requena et al., 1997). Επομένως τα μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων να οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα των TBARS.

ii. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της TAC τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, τα οποία μειώθηκαν κάτω από την επίδραση του tBHP. Η TAC αποτελεί έναν δείκτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Κάθε μεμονωμένο αντιοξειδωτικό συνεισφέρει διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η βιταμίνη C και E αντιπροσωπεύουν το ένα τέταρτο της TAC. Η GSH έχει την ικανότητα να διατηρεί τα εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C και E στην ανηγμένη (ενεργή) μορφή τους, και είναι ίσως και ένας από τους παράγοντες που συνέβαλε στην αύξηση των επιπέδων της TAC καθώς τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

iii. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα της GSH τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, καθώς ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP είχε μειώσει τα επίπεδα της. Αυτή η επίδραση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος πιθανώς οφείλεται στο πλούσιο περιεχόμενο της σε κυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της GSH.

iv. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος μείωσε τα επίπεδα της GSSG τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από τα αυξημένα επίπεδα της GSH, καθώς 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<sub>x</sub>. Ο παράγοντας tBHP οξειδώνει την GSH μέσω της δράσης της GP<sub>x</sub> και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα GSSG (Lima et al., 2006). 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. Επίσης, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος όπως έδειξε η παρούσα μελέτη παρουσιάζει και η ίδια ικανότητα άμεσης εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, ενώ ενεργοποιεί διαφορετικά ματιοξειδωτικά ένζυμα (π.χ. την καταλάση, τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου). Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα να καταναλώνονται μικρότερες ποσότητες GSH για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και άρα να γίνεται εξοικονόμηση της και να ελαττώνεται η παραγωγή της GSSG.

Τα συμπεράσματα από την μελέτη του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου η αιγοπρόβεια πρωτεΐνης ορού γάλακτος ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων, και συγκεκριμένα η επίδρασή της στην πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 καθώς και στην πρωτεϊνική έκφραση και ενζυμική δράση ενός αριθμού αντιοξειδωτικών ενζύμων που ρυθμίζονται από αυτόν έδειξαν ότι:

i. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα του Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 ενώ δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα του Nrf2 στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Άρα, ο μοριακός μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο δρα.

ii. Η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος αύξησε τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης και ενζυμικής δράσης της SOD τόσο στα μυϊκά κύτταρα C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Ακόμη, αυξήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης και ενζυμικής δράσης της CAT και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της HO-1, επίσης αυξήθηκαν και στα C2C12 και στα EA.hy926 κύτταρα. Τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GCS αυξήθηκαν μόνο στα C2C12 κύτταρα ενώ στα EA.hy926 δεν υπήρχε καμία επίδραση. Τέλος, η ενζυμική δράση της GST αυξήθηκε και στα C2C12 και στα EA.hy926 κύτταρα. Η αύξηση των ενζύμων στα EA.hy926 κύτταρα οφείλεται στην ενεργοποίηση του Nrf2, ο οποίος όταν ενεργοποιείται μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στα AREs των ενζύμων και επάγει τη μεταγραφή τους. Στα C2C12 κύτταρα παρόλο που δεν ενεργοποιήθηκε ο παράγοντας Nrf2, υπήρξε ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στα μυϊκά κύτταρα πιθανώς να έχει ενεργοποιηθεί κάποιος άλλος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος οδηγεί στην

ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η ενεργοποίηση αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενζύμων μεταβολισμού της φάσης II, είναι ίσως ένας από τους παράγοντες που συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση που εμφάνισε η πρωτεΐνη ορού γάλακτος στις κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy926. Η GCS είναι το ένζυμο που καταλύει το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση της GSH, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την κυστεΐνη. Η αύξηση των επιπέδων της GCS στα C2C12 κύτταρα ίσως να οδήγησε στη σύνθεση της GSH μέσω των υποστρωμάτων κυστεΐνης που παρείχε η πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Η GST είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στην αποτοξίνωση των ROS και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Επόμεως, η αύξηση των επιπέδων της GST από την πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι ένας από τους παράγοντες που συνέβαλε στην μείωση των επιπέδων των ROS και των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) που παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές C2C12 και EA.hy926 καθώς και στη μείωση των TBARS στους αθλητές μετά από έντονη άσκηση. Ένα άλλο ένζυμο, η HO-1 εμφανίζει εκτός από αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και ίσως να συμβάλλει στην αντιφλεγμονώδη δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους αθλητές μετά από έντονη άσκηση.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επίδραση του σκευάσματος υδατανθράκων – αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής μετά από εξαντλητική ποδηλασία σε ανθρώπους είναι τα εξής:

i. Είναι η πρώτη μελέτη στην οποία χορηγείται σκεύασμα υδατανθράκων-πρωτεϊνών υπό μορφή κέικ καθώς προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιούσαν σκευάσματα υπό μορφή ροφημάτων.

ii. Το σκεύασμα μείωσε τα επίπεδα των TBARS που αποτελεί δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα των υπόλοιπων δεικτών (πρωτεϊνικά καρβονύλια, GSH, CAT, TAC). Η πιθανή αντιοξειδωτική δράση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος μπορεί να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη και μεθειονίνη μέσω ενδοκυτταρικής μετατροπής της σε GSH.

iii. Το σκεύασμα δεν επηρέασε την απόδοση της άσκησης όπως υπολογίστηκε από τον χρόνο μέχρι την εξάντληση μετά από ποδηλασία σε ένταση που αντιστοιχεί στο 95% του  $VO_{2max}$ . Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών είναι αντιφατικά, με κάποιες μελέτες να δείχνουν βελτίωση της απόδοσης (Ivy et al., 2003; Saunders et al.,

2004, 2007; Betts et al., 2007; Niles et al., 2001) και κάποιες άλλες να βρίσκουν ότι δεν υπάρχει κάποια επίδραση (Haff et al., 200; Baty et al., 2007; Betts et al., 2005). Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των ερευνών μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό τύπο άσκησης που χρησιμοποιείται, την διαφορετική πηγή πρωτεΐνης καθώς και το ποσό πρωτεΐνης που προστίθεται στο σκεύασμα των υδατανθράκων.

iv. Το σκεύασμα μείωσε τα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6 και αύξησε τα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

v. Το σκεύασμα μείωσε τα επίπεδα της CRP, μιας πρωτεΐνης οξείας φάσης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η CRP συντίθεται στο ήπαρ σε απόκριση στην αύξηση φλεγμονωδών μεσολαβητών, κυρίως της IL-6. Επομένως, τα μειωμένα επίπεδα της μετά τη χορήγηση του σκευάσματος πιθανώς να σχετίζονται με τα μειωμένα επίπεδα της IL-6.

vi. Η αντιφλεγμονώδης δράση του σκευάσματος μπορεί να αποδοθεί στο περιεχόμενο της σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Η χορήγηση υδατανθράκων διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος σε υψηλά επίπεδα και έτσι μετριάζει την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης και της επινεφρίνης και των προ- και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Η συμβολή της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην αντιφλεγμονώδη δράση του σκευάσματος πιθανώς να οφείλεται σε κάποια από τα συστατικά της. Είναι ενδιαφέρον ότι σε μια μελέτη σε επίμυες, η λακτοφερρίνη εμφάνισε αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μειώνοντας τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  και αυξάνοντας τα επίπεδα της IL-10 (Kobayashi et al., 2011).

vii. Η αντιφλεγμονώδης δράση του σκευάσματος μπορεί επίσης να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική του δράση. Ο αυξημένος σχηματισμός ROS κατά την άσκηση μπορεί να ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες (NF- $\kappa$ B) που ρυθμίζουν τη σύνθεση της IL-6 (Fischer, 2006).

viii. Η μακροχρόνια πρόσληψη του σκευάσματος θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής και ως εκ τούτου θα μπορούσε να αποτρέψει το σύνδρομο της υπερπροπόνησης (Margonis et al., 2007; Tanskanen et al., 2010).



Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν μετά από χορήγηση σε ανθρώπους ενός σκευάσματος, ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής ή ως συστατικό σε βιολειτουργικά τρόφιμα για τη βελτίωση των δυσμενών επιπτώσεων της εξαντλητικής άσκησης στην απόδοση των αθλητών λόγω του επαγόμενου οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα σκευάσματα με πρωτεΐνη ορού γάλακτος θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ίσως γενικότερα και για την πρόληψη και βελτίωση παθολογικών καταστάσεων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες όπως καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνος και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ασκεί αυτές τις προστατευτικές δράσεις της. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα σχετικά με τα βιολειτουργικά τρόφιμα και τα διατροφικά συμπληρώματα είναι ότι δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις για τους ισχυρισμούς υγείας τους, το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με την όσο το δυνατόν καλύτερη κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν τις ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου δράσεις τους.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Afroundeh, R., Siahkouhian, M., Khalili, A. (2010). The effect of post-exercise carbohydrate ingestion on inflammatory responses to short time, high-force eccentric exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 50, 182–188.
- Aguilo, A., Tauler, P., Fuentespina, E. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.* 84(1), 1-7.
- Ajello, M., Greco, R., Giansanti, F., massucci, M.T., Antonini, G., Valenti, P. (2002). Antiinvasive activity of bovine lactoferrin towards group A Streptococci. *Biochem. Cell Biol.* 80, 119-124.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 218-24.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to *tert*-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119-127.
- Ames, B.N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog. Clin. Biol. Res.* 206, 3-32.
- Ames, B.n., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6858-6862.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2001). Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131, 856S-860S.
- Antunes, F., Han, D., Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1260-1267.
- Aoe S, Toba Y, Yamamura J., Kawakami, H., yahiro, M., Kumegawa, M., Itabashi, A., Takada, Y. (2001). Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 913-918.

- 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.
- Araujo, I.M., Carvalho, C.M. (2005). Role of nitric oxide and calpain activation in neuronal death and survival. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 319–324.
- Aruoma, O.I. (1999). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Agric. Food Chem.* 47, 397-492.
- 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.
- Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., Young, I.S., Jackson, S.K., Davies, B., Peters, J.R. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 77, 498-502.
- 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.
- Aw, T.Y. (2003) Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* 18, 201–204.
- Balon, T.W., Nadler, J.L. (1994). Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 77, 2519–2521.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16093–16098.
- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 347–366.
- Bartfay, W.J., Davis, M.T., Medves, J.M., Lugowski, S. (2003). Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron overload cardiomyopathy. *Can. J. Cardiol.* 19, 1163–1168.
- Batish, V.K., Chander, H., Zumdegeni, K.C., Bhtia, K.L., Singh, R.S. (1988). Antibacterial activity of lactoferrin against some common food-borne pathogenic organisms. *Aust. J. Dairy Tech.* 5, 16-18.
- Baty, J.J., Hwang, H., Ding, Z., Bernard, J.R., Wang, B., Kwon, B., Ivy, J.L. (2007). The effect of a carbohydrate and protein supplement on resistance exercise performance, hormonal response, and muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* 21, 321–329.

- Beaton, L.J., Tarnopolsky, M.A., Phillips, S.M. (2002). Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. *J. Physiol.* 544, 849- 859.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19633-19636.
- Belcastro, A.N., Shewchuk, L.D., and Raj, D.A. (1998). Exercise-induced muscle injury; a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochem.* 179, 135–145.
- Bettors, J.L., Criswell, D.S., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K.C., Deering, M., Yimlamai, T., Powers, S.K. (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1179–1184.
- Betts, J., Williams, C., Duffy, K., Gunner, F. (2007). The influence of carbohydrate and protein ingestion during recovery from prolonged exercise on subsequent endurance performance. *J. Sports Sci.* 25, 1449–1460.
- Betts, J.A., Stevenson, E., Williams, C., Sheppard, C., Grey, E., Griffin, J. (2005). Recovery of endurance running capacity: effect of carbohydrates–protein mixtures. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 15, 590–609.
- Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E. (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active Oxygen in Chemistry*. Foole CS, Valentine JS, Greenber A, Liebman JF(eds). Chapman and Hall, London, pp.66-104.
- Bigard, A.X. (2001). Lesions musculaires induites par l' exercice et surentrainement. *Sci. Sports.* 16, 204-215.
- Bjorck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res.* 45, 109-118.
- Bjornstedt, M., Kumar, S., Bjorkhem, L., Spyrou, G., Holmgren, A. (1997). Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed. Environ. Sci.* 10, 271–279.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14930–14935.
- Booth, F.W., Gordon, S.E., Carlson, C.J., Hamilton, M.T. (2000). Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J. Appl. Physiol.* 88(2),774-787.
- Borsheim, E., Tipton, K.D., Wolf, S.E., Wolfe, R.R. (2002). Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E648–E657.

- Bos, C., Gaudichon, C., Tome, D. (2000). Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 191S–205S.
- Bounous, G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20, 4785-4792.
- Bounous, G., Kongshavn, P.A. (1982). Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J. Nutr.* 112, 1747-1755.
- Bounous, G., Kongshavn, P.A. (1985). Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J. Nutr.* 115, 1403-1408.
- Boxer, L.A., Coates, T.D., Haak, R.A., Wolach, J.B., Hoffstein, S., Baehner, R.L. (1982). Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function. *N. Engl. J. Med.* 307, 404-410.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28, 25-30.
- Breimer, L.H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* 3, 188–197.
- Breton-Gorius, J., Mason, D.Y., Buriot, D., Vilde, J.L., Griscelli, C. (1980). Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy. *Am. J. Pathol.* 99, 413-428.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathioneperoxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951–965.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol. Chem.* 387, 1329–1335.
- Bucci, I.R., Unlu, I.M. (1999). Proteins and amino acid supplements in exercise and sport. In: *Energy-Yielding Macronutrients and Energy Metabolism in Sports Nutrition*. J.A. Driskell and I. Wolinsky, eds. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 191–212.
- Burke, L.M., Kiens, B., and Ivy, J. (2004). Carbohydrates and fat for training and recovery. *J. Sports Sci.* 22, 15–30.
- Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G.A., Folkerts, G., Friedmann, P.S., Frost, G.S., Guarner, F., Løvik, M., Macfarlane, S., Meyer, P.D., M'Rabet, L., Serafini, M., van Eden, W., van Loo, J., Vas Dias, W., Vidry, S., Winklhofer-Roob, B.M., Zhao, J. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br. J. Nutr.* 101 (Suppl. 1), S1–S45.

- 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.
- Callahan, L.A., Stofan, D.A, Szweda, L.I., Nethery, D.E., G.S. Supinski, G.S. (2001). Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 129–138.
- Cannon, J.G., St Pierre, B.A. (1998). Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury, *Mol. Cell Biochem.* 179, 159–167.
- Cannon, J.G., Evans, W.J., Hughes, V.A., Meredith, C.N., Dinarello, C.A. (1986). Physiological mechanisms contributing to increased interleukin- 1 secretion. *J. Appl. Physiol.* 61, 1869–1874.
- Cannon, J.G., Kluger, M.J. (1983). Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science.* 220, 617–619.
- Cao, G., Prior, R.L. (2000). Postprandial increases in serum antioxidant capacity in older women. *J. Appl. Physiol.* 89, 877-883.
- Carlioz, A., Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *E. coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.*, 5, 623–630.
- Carruth, B.R., Skinner, J.D. (2001). The role of dietary calcium and other nutrients in moderating body fat in preschool children. *Int. J. Obesity.* 25, 559–66.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- Chanda, S., Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3, 981–996.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49, 481-93.
- Cherednichenko, G., Zima, A.V., Feng, W., Schaefer, S., Blatter, L.A., Pessah, I.N. (2004). NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release. *Circ. Res.* 94, 478–486.
- Chung, S.K., Osawa, T., Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 61, 118–123.
- Clarke, J., Butler, R., Howarth, G., Read, L., Reqester, G. (2002). Exposure of oral mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy-induced mucositis in the hamster. *Oral Oncol.* 38, 478-485.
- Clarkson, P.M., Sayers, S.P. (1999). Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can. J. Appl. Physiol.* 24, 234-248.

- Coleman, J.W. (2002). Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 4-10.
- Coomes, J.S., Powers, S.K., Rowell, B., Hamilton, K.L., Dodd, S.L., Shanely, R.A., Sen, C.K., Packer, L. (2001). Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J. Appl. Physiol.* 90, 1424-1430.
- Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueiri, T., Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 2280-2285.
- Cosio-Lima, L.M., Desai, B., Stelzer, J.W., Schuler, P.B. (2012). Effects of a 4:1 carbohydrate/protein solution versus a carbohydrate-alone solution on IL-6, TNF- $\alpha$  and cortisol during prolonged cycling in hot environmental conditions. *J. Sports Med.* 3, 21–26.
- Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 591-598.
- Crinnion, W.J. (2000). Environmental medicine, part 2 – health effects of and protection from ubiquitous airborne solvent exposure. *Altern. Med. Rev.* 5, 133-143.
- 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.
- 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.
- Davies, K.J., Maguire, J.J., Brooks, G.A., Dallman, P.R., Packer, L. (1982). Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply, work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 242, E418–E427.
- Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1198-1205.
- Davies, K.J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F., Hochstein, P. (1986). Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235, 747-754.
- Davies, K.M., Heaney, R.P., Recker, R.R., Lappe, J.M., Barger-Lux, M.J., Rafferty, K., Hinders, S. (2000). Calcium intake and body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4635–4638.
- Davis, J.M., Cokkinides, V.E., Burgess, W.A., Bartoli, W.P. (1989). Effects of a carbohydrate-electrolyte drink or water on the stress hormone response to prolonged intense cycling: renin, angiotensin I, aldosterone, ACTH, and cortisol. In: *Hormones and Sports*, edited by Z. Laron and A. D. Rogol. New York: Raven, pp. 193–204.

- Dekkers, J.C., van Doormen, L.J., Kemper, H.C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 21, 213-238.
- Devasagayam, T.P.A., Bloor, K.K., Ramsarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian J. Bioche. Biophys.* 40, 300-308.
- Di Mario, F., Aragona, G., Dal Bo, N., Cavestro, G.M., Cavallaro, L., Iory, V., Leandro, G., Pilotto, A., Franze, A. (2003). Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. *Dig. Liver Dis.* 35, 706-710.
- Di Meo, S., Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol. Signals Recept.* 10, 125-140.
- Di Pasquale, M.G. Proteins and amino acids in exercise and sport. In: *Energy-Yielding Macronutrients and Energy Metabolism in Sports Nutrition*. J.A. Driskell and I. Wolinsky, eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 1999. pp. 119–162.
- Diaz, M., Decker, E. A. (2005). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8208–8213.
- Diaz, M., Dunn, C.M., McClements, D.J., Decker, E. A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2365–2370.
- Dillar, C.J., Walzem, R.L., German, J.B. (2002). Whey components: Millennia of Evolution create functionalities for mammalian nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 353-375.
- Dinarello, C.A. (1997). Cytokines as endogenous pyrogens. In Mackowiak PA editors. *Fever: basic mechanisms and management*. 2nd edition, Philadelphia: Lippincott-Raven. 87-116.
- 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.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102-1115.
- Downey, J.M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 487-504.
- Dragan, I., Stroescu, V., Stoian, I., Georgescu, E., Baloescu, R. (1992). Studies regarding the efficiency of Supro isolated soy protein in Olympic athletes. *Rev. Roum. Physiol.* 29, 63–70.



- Drevet, J.R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell Endocrinol.* 250, 70–79.
- Duh, P.D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa Linne*): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J. Am.Chem. Soc.* 75, 269-277.
- Dupri-Crochet, S., Erard, M., & Nobe, O. (2013). ROS production in phagocytes: Why, when, and where? *J.of Leucoc. Biol.* 94, 657–670.
- Early, E.M., Hardy, H., Forde, T., Kane, M. (2001). Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Appl. Microbiol.* 90, 741-748.
- Edward, T.H. (2005). A new perspective on the biology of C-reactive protein. *Circ. Res.* 97, 609–611.
- Elia, D., Stadler, K., Horvath, V., Jakus, J. (2006). Effect of soy- and whey protein isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *Eur. J. Nutr.* 45, 259–266.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 430–441.
- Elsayed, N.M., Omaye, S.T., Klain, G.J., Korte, D.W.J. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology.* 72, 153-165.
- Esch, T., Stefano, G.B. (2002). Proinflammation: A common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. *Med. Sci. Monit.* 8(5), HY1-9.
- Espinosa, A., Leiva, A., Pena, M., Muller, M., Debandi, A., Hidalgo, C., Carrasco, M.A., Jaimovich, E. (2006). Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca<sup>2+</sup> stimulates ERK, CREB, early genes. *J. Cell Physiol.* 209, 379– 388.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 647-652.
- Evans, W.J., Meredith, C.N., Cannon, J.G., Dinarello, C.A., Fronter, W.R., Hughes, V.A., Jones, B.H., Knuttgen, H.G. (1986). Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J. Appl. Physiol.* 61, 1864–1868.
- Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, M. (2004). The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1097–1104.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18, 872–879.
- Faraji, H., McClements, D.J., Decker, E.A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4558–4564.

- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 16, 1335–1347.
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. (2005). Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 33, 114–119.
- Fehrenbach, E., Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.* 7, 66-89.
- Ferguson-Stegall, L., McCleave, E.L., Ding, Z., Kammer, L.M., Wang, B., Doerner, P.G., Liu, Y., Ivy, J.L. (2010). The effect of a low carbohydrate beverage with added protein on cycling endurance performance in trained athletes. *J. Strength Cond. Res.*,24, 2577–2586.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4), 327-358.
- Fischer, C.P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 6–33.
- Fischer, D.R., Sun, X., Williams, A.B., Gang, G., Pritts, T.A., James, J.H., Molloy, M., Fischer, J.E., Paul R.J., Hasselgren, P.O. (2001). Dantrolene reduces serum TNFalpha and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats. *Shock.* 15, 200–207.
- Foresti, R., Goatly, H., Green, C.J., Motterlini, R. (2001). Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, 1976–1984.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58, 61–97.
- Froiland, K., Koszewski, W., Hingst, J., Kopecky, L. (2004). Nutritional supplement use among college athletes and their sources of information. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metabol.* 14, 104-120.
- Fuchs, J. (1995). *Oxidative Injury in Dermatology*. New York: Springer-Verlag, 1992. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 73–101.
- Fuchs, J., Weber, S., Podda, M., Groth, N., Herrling, T., Packer, L., Kaufmann, R. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 330-336.
- Gahr, M., Speer, C.P., Damerau, B., Sawatzki, G. (1991). Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 49, 427-433.

- Gameel, A.A., Tartour, G. (1974). Hematological and Plasma-Protein Changes in Sheep Experimentally Infected with *Corynebacterium- pseudotuberculosis*. *J. Comp. Path.* 84, 477-484.
- Garner, B., Witting, P.K., Waldeck, A.R., Christison, J.K., Raftery, M., Stocker, R. (1998b). Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J. Biol. Chem.* 273, 6080–6087.
- Garner, B., Waldeck, A.R., Witting, P.K., Rye, K.A., Stocker, R. (1998a). Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J. Biol. Chem.* 273, 6088–6095.
- Gill, H.S., Rutherford, K.J., Cross, M.L. (2000). Bovine milk: a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In: Buttriss J, Saltmarsh M, eds. *Functional Foods II – Claims and Evidence*. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press 248, 82-90.
- Giudice, A., Montella, M. (2006.) Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays.* 28, 169–181.
- Gleeson, M., Bishop, N., Stensel, D.J., Lindley, M.R., Mastana, S.S., Nimmo, M.A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 607–615.
- Gleeson, M., Bishop, N.C. (2005). The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann. Transplant.* 10, 43–48.
- Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W.C., Brooks, G.A., Packer, L. (1988). Blood glutathione oxidation during human exercise. *J. Appl. Physiol.* 64, 115-119.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* 1, 117-123.
- Goldfarb, A.H., Cho, C., Cho, H., Romano-Ely, B., Kent Todd, M. (2009). Protein and antioxidants in an isocaloric carbohydrate drink: effect on plasma oxidative stress markers and IL-6. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 19, 115–126.
- Gomez-Cabrera, M.C., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Ji, L.L., Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* 567, 113–120.
- Gong, M.C., Arbogast, S., Guo, Z., Mathenia, J., Su, W., Reid, M.B. (2006). Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 100, 399–405.
- Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., King, P.A., Horton, E.D., Thompson, C.M., and Horton, E.S. (1990). Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise. *J. Appl. Physiol.* 68, 193–198.

- Grootveld, M., Halliwell, B. (1987). Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem. J.* 243, 803-808.
- Grune, T., Reinhecker, T., Davies, K.J.A. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11, 526-534.
- 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.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, O.I., Oktay, M., Büyükköroğlu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J.Ethnopharmacol.* 90, 205–215.
- Ha, E., Zemel, M.B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. Nutr. Biochem.* 14, 251-258.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.* 249, 7130-7139.
- Haff, G.G., Koch, A.J., Potteiger, J.A., Kuphal, K.E., Magee, L.M., Green, S.B., Jakicic, J.J. (2000). Carbohydrate supplementation attenuates muscle glycogen loss during acute bouts of resistance exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 10, 326–339.
- Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M.J., Johnston, J.M., Badger, J.M. (2001). Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 555-558.
- Hakkak, R., Korourian, S., Shelnett, S.R., Lensing, S., Ronis, M.J., Badger, T.M. (2000). Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 113-117.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd ed). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, p. 229-233.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253–265.
- Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In J. Wiley & Halliwell, B. (2001). *Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 2007.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford Science Publications (Chapter 2).
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. (1998). Free radicals in biology and medicine. *Oxford Science Publications* Third Edition.
- Hamada, K., Vannier, E., Sacheck, J.M., Witsell, A.L., Roubenoff, R. (2005). Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. *FASEB J.* 19, 264-266.
- Hartley, D.P., Ruth, J.A., Petersen, D.R. (1995) The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 197–205.
- Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S.J, Tamatani, T., Kitajima, M., Makino, N., Ishimura, Y., Suematsu, M. (1999). Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 85, 663–671.
- Hayes, J.D., McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 300, 156-166.
- Hellsten, Y., Sjodin, B., Richter, E.A., Bangsbo, J. (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 274, E600-606.
- Hellsten, Y., Tullson, P.C., Richter, E.A., Bangsbo, J. (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 169-174.
- Henson, D.A., Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Shannon, M., Bolton, M.R., Davis, J.M., Gaffney, C.T., Kelln, W.J., Austin, M.D., Hjertman, J.M., Schilling, B.K. (2000). Influence of carbohydrate on cytokine and phagocytic response to 2 h of rowing. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 1384–1389.

- Hidalgo, C., Sanchez, G., Barrientos, G., Aracena-Parks, P. (2006). A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 281, 26473–26482.
- Hirschfield, W., Moody, M.R., O'Brien, W.E., Gregg, A.R., Bryan, R.M Jr, Reid, M.B. (2000). Nitric oxide release and contractile properties of skeletal muscles from mice deficient in type III NOS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R95–R100.
- 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.
- Hojo, Y. (1986). Sequential study on glutathioneperoxidase and selenium contents of human milk. *Sci. Total Environ.* 52, 83-91.
- Honda, K., Casadesus, G., Paterson, R.B., Perry, G., Smith, M.A. (2004). Oxidative stress and redox iron in Alzheimer's disease. *Ann. New York Acad. Sci.* 1012, 179-182.
- Hood, D. A., Ugucioni, G., Vainshtein, A., D'souza, D. (2011). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Implications for health and disease. *Compr. Physiol.* 1, 1119–1134.
- Hooper, D.C., Scott, G.S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R.B., Koprowski, H., Spitsin, S.V. (2000). Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.* 14, 691-698.
- Hooper, D.C., Spitsin, S., Kean, R.B., Champion, J.M., Dickson, G.M., Chaudhry, I., Koprowski, H. (1998). Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 20, 675-680.
- Hu, M., McClements, D.J., Decker, E.A. (2003). Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agr. Food Chem.* 51, 1435–1439.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M., (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic–nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8, 379–391.
- Ivy, J.L. (2004). Regulation of muscle glycogen repletion, muscle protein synthesis and repair following exercise. *J. Sports Sci.Med.* 3, 131–138.
- Ivy, J.L., and Kuo, C.H. (1998). Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. *Acta Physiol. Scand.* 162, 295–304.
- Ivy, J.L., Goforth Jr., H.W., Damon, B.M., McCauley, T.R., Parsons, E.C., Price, T.B. (2002). Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate–protein supplement. *J. Appl. Physiol.* 93, 1337–1344.

- Ivy, J.L., Res, P.T., Sprague, R.C., Widzer, M.O. (2003). Effect of a carbohydrate–protein supplement on endurance performance during exercise of varying intensity. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 13, 382–395.
- Janaszewska, A., Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 231–236.
- Janeway (2005). *Immunobiology* 6th edition. New York: Taylor and Francis Group; Garland Science.
- Javesghani, D., Magder, S.A., Barreiro, E., Quinn, M.T., Hussain, S.N. (2002). Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 412–418.
- Jenkins, R.R. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med.* 5, 156–170.
- Ji, L.L. (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp. Gerontol.* 42, 582–593.
- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 425–435.
- Jiang, B., Xu, S., Hou, X., Pimentel, D.R., Brecher P., Cohen, R.A. (2004). Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 1323–1329.
- Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M.J., Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 625–635.
- Jones, E.M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L., Millar, M.R. (1994). Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 208–214.
- Jonsdottir, I.H., Schjerling, P., Ostrowski, K., Asp, S., Richter, E.A., Pedersen, B.K. (2000). Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J. Physiol.* 528 (Pt 1), 157–163.
- Joshua, B., Owen, D., Butterfield, A. (2010). Measurement of oxidized/Reduced glutathione ratio. Protein misfolding and cellular stress in Disease and aging. *Methods Mol. Biol.* 648, , pp. 269–277.
- Kamata, H., Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal.* 11, 1–14.
- Kamau, S.M., Lu, R.R. (2011). The effects of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Cur. Res. Dairy Sci.* 3, 25–35.
- Kaminsky, D.E., Shute, M. (2001). Cytokine changes after a marathon race. *J. Appl. Physiol.* 91, 109–114.

- Kanner, J. Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1388-1395.
- Karolkiewicz, J., Szczesniak, L., Kasprzak, Z., Rychlewski, T. (2001). The influence of endurance training and carbohydrate and protein supplementation on concentrations of reduced glutathione (GSH) in red blood cells and TBARS in blood plasma of athletes. *Med. Sports.* 17, 119–125.
- Kato, K., Toba, Y., Matsuyama, H. (2000). Milk basic protein enhances the bone strength in ovariectomized rats. *J. Food. Biochem.* 24, 467- 476.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.* 83, 255-263.
- Kean, R.B., Spitsin, S.V., Mikheeva, T., Scott, G.S., Hooper, D.C. (2000). The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J. Immunol.* 165, 6511-6518.
- Keap1 regulates both cytoplasmic–nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8, 379–391.
- Keles, M.S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 28, 141–143.
- Kelly, V.P., Ellis, E.M., Manson, M.M., Chanasm, S.A., Moffat, G.J., McLeord, R., Judah, D.J., Neal, G.E., Hayes, J.D. (2000). Chemoprevention of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Res.* 60, 957–969.
- Kensler, T.W., Wakabayash, N., Biswal, S., (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116.
- Kerasiotti, E., Kiskini, A., Veskoukis, A., Jamurtas, A., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A.M., Koutedakis, Y., Stagos, D., Kouretas, D., Karathanos, V. (2012). Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2805–2810.
- 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.



- Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2002). Control of protein synthesis by amino acid availability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 5, 63-67.
- Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2004). Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 423–427.
- Kobayashi, S., Abe, Y., Inanami, O., Oda, S., Yamauchi, K., Hankanga, C., Yasuda, J., Sato, R. (2011). Oral administration of bovine lactoferrin upregulates neutrophil functions in a dog with familial b2-integrin-related neutrophil dysfunction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 155–161.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Brecht, D.S., Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 372, 546–548, 1994.
- Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J.L., Reid, M.B., Stamler, J.S. (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 375–381.
- Koh, T.J. (2002). Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 117-121.
- Koren, A., Sauber, C., Sentjurc, M., Schara, M. (1983). Free radicals in tetanic activity of isolated skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 74, 633–635.
- Koren, H.S. (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ. Health Perspect.* 103, 235-242.
- Kosikowski, F.V. (1982). Whey and whey foods. In F. V. Kosikowski (Ed.), *Cheese and Fermented Milk Foods* (pp. 446–469). New York: Edwards Brothers.
- Kreider, R.B. (1999). Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. *Sports Med.* 27, 97–110.
- Kuhara, T., Iigo, M., Itoh, T., Ushida, Y., Sekine, K., Terada, N., Okamura, H., Tsuda, H. (2000). Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr. Cancer* 38, 192-199.
- Kulczycki, A. Jr., MacDermott, R.P. (1985). Bovine IgG and human immune responses: Con A-induced mitogenesis of human mononuclear cells is suppressed by bovine IgG. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 77, 255-258.
- 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.

- Kussendrager K.D., van Hooijdonk, A.C. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84, S19-S25.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., Kensler, T.W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 8135–8145.
- Lajoie, N., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2001). Improved storage stability of model infant formula by whey peptides fractions. *J. Agr. Food Chem.* 49, 1999–2007.
- Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.* 463, 247–283.
- Lands, L.C., Grey, V.L., Smountas, A.A. (1999). Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J. Appl. Physiol.* 87, 1381–1385.
- Latour, I., Demoulin, J.B., Buc-Calderon, P. (1995). Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters.* 373, 299-302.
- Laursen, I., Briand, P., Lykkesfeldt, A.E. (1990). Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res.* 10, 343-351.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P.A. Holloszy, J.O., Heinecke, J.W. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 186-192.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366, 53-67.
- Lenaz, G., D'Aurelio, M., Merlo Pich, M., Genova, M.L., Ventura, B., Formiggini, G., Castelli, G. (2000). Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 397-404.
- Levenhagen, D.K., Carr, C., Carlson, M.G., Maron, D.J., Borel, M.J., and Flakoll, P.J. (2002). Postexercise protein intake enhances whole-body and leg protein accretion in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 828–837.
- Levenhagen, D.K., Gresham, J.D., Carlson, M.G., Maron, D.J., Borel, M.J., and Flakoll, P.J. (2001). Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E982–E983.
- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790-796.

- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskowitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing. and Devel.* 107, 323–332.
- Levine, R.L., Moskowitz, J., Stadtman, E.R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *Intl. Union Biochem. Mole. Biol. Life.* 50, 301–307.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 15036–15040.
- Li, J., Lee, J.M., Johnson, J.A. (2002). Microarrayanalysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 388–394.
- Li, X., Moody, M.R., Engel, D., Walker, S., Clubb, F.J., Sivasubramanian, N., Mann, D.L., Reid, M.B. (2000). Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation.* 102, 1690–1696.
- Li, Y.P., Reid, M.B. (2000). NF- $\kappa$ B mediates the protein loss induced by TNF- $\alpha$  in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1165–1170.
- Li, Y.P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann D.L., Reid, M.B. (2005). TNF- $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 19, 362–370.
- Li, Y.P., Chen, Y., Li A.S., Reid, M.B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C806–812.
- Li, Y.P., Lecker, S.H., Chen, Y., Waddell, I.D., Goldberg A.L., Reid, M.B. (2003). TNF- $\alpha$  increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up regulating UbcH2/E220k. *FASEB J.* 17, 1048–1057.
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat. Res.* 443, 129-138.
- 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.
- Lin, Y.C., Lyle, R.M., McCabe, L.D., McCabe, G.P., Weaver, C.M., Teegarden, D. (2000). Dairy calcium is related to changes in body composition during a two-year exercise intervention in young women. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 754–60.
- Linnane, A.W., Zhang, C., Yarovaya, N., Kopsidas, G., Kovalenko, S., Papakostopoulos, P., Eastwood, H., Graves, S., Richardson, M. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 396-411.

- Liu, M.L., Bergholm, R., Makimattila, S., Lahdenpera, S., Valkonen, M., Hilden, H., Yki-Jarvinen, H., Taskinen, M.R. (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation *in vitro* and modifies plasma antioxidants. *Am. J. Physiol.* 276, 1083-1091.
- Livingstone, C., Davis, J. (2007). Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *Brit. J. DiabetesVasc. Dis.* 7, 258–265.
- Livrea, M.A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintaudi, A.M., Ciaccio, M., Riccio, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 401-409.
- 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.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I. (1987). Are indices of radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol.* 56, 313-316.
- Lu, C.L., Baker, R.C. (1986). Characteristic of egg yolk phosphovitin as an antioxidant for inhibiting metal-catalyzed phospholipid oxidations. *Poult. Sci.* 65, 2065–2070.
- Lu, S. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.* 13, 1169–1183.
- Lu, S.C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* 36, 95-116.
- Machnicki, M., Zimecki, M., Zagulski, T. (1993). Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* 74, 433-439.
- MacIntyre, D.L., Reid, W.D., Lyster, D.M., McKenzie, D.C. (2000). Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 47-53.
- Mackinnon, L.T. (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, S369-S376.
- Malm, C., Nyberg, P., Engstrom, M., Sjodin, B., Lenkei, R., Ekblom, B., Lundberg, I. (2000). Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J. Physiol.* 529, 243-262.
- Malm, C., Sjodin, T.L., Sjoberg, B., Lenkei, R., Renstrom, P., Lundberg, I.E., Ekblom, B. (2004). Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J. Physiol.* 556: 983-1000.

- Marklund, N., Ostman, B., Nalmo, I., Persson, L., Hillered, L. (2000). Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions. Description of a HPLC method and human brain microdialysis data. *Acta Neurochir.* 142, 1135-1141.
- Markus, C.R., Olivier, B., de Haan, E.H. (2002). Whey protein rich in alpha-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 1051–1056.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9, 136–156.
- Martín, C., Martínez, P., Navarro, R., Ruiz-Sanz, J.I., Lacort, M., Ruiz-Larrea, M.B. (2000). *Tert*-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem. Pharm.* 62, 705–712.
- Marz, R. (2002). *Medical Nutrition from Marz*, 2nd ed. Portland, OR: Omni Press;
- Mastaloudis, A., Leonard, S.W., Traber, M.G. (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 911-922.
- Mastorakos, G., Pavlatou, M., Diamanti-Kandarakis, E., Chrousos, G.P. (2005). Exercise and the stress system. *Hormones.* 4, 73–89.
- Maulik, N., Yoshida, T., Engelman, R.M., Bagchi, D., Otani, H., Das, D.K. (2000). Dietary coenzyme Q(10) supplement renders swine hearts resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H 1084-1090.
- Maynard, C.L., Weaver, C.T. (2008). Diversity in the contribution of IL-10 to cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* 226, 219–233.
- McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Utter, A.C., Henson, D.A., Dumke, C.L., Vinci, D.M. (2003). Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stress and plasma antioxidant potential following a 3 h run. *Free Radical Res.* 37, 835–840.
- McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Utter, A.C., Dumke, C.L. (2005). Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free Rad. Res.* 39, 1219–1224.
- McArdle, A., Patwelle, D., Vasilaki, A., Griffiths, R.D., Jackson, M.J. (2001). Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C621–C627.
- McClung, J. M., Deruisseau, K. C., Whidden, M. A., Van Remmen, H., Richardson, A., Song, W., Vrabas. I.S., Powers, S.K.. (2010). Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Exp. Physiol.* 95, 222–231.

- McCormick, J.A., Markey, G.M., Morris, T.C. (1991). Lactoferrin-inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* 83, 154-156.
- Meeus, M., Nijs, J., Hermans, L., Goubert, D., & Calders, P. (2013). The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: Peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin. Ther. Targets.* 17, 1081–1089.
- Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
- Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 783–792.
- Meydani, M. Evans, W.J. (1993). Free radicals, exercise and aging. In: Yu BP, Ed *Free Radicals in Aging* Boca raton, FL: CRC Press, pp 183-204.
- Meydani, M., Evans, W., Handelman, G., Fielding, R.A., Meydani, S.N, Fiatarone, M.A., Blumberg, J.B., Cannon, J.G. (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 669, 363-364.
- Meydani, M., Evans, W.J. (1993). Free radicals and aging. In *Free Radical in Aging*. (Ed. Yu, B.P. Boca Raton). Pp 183-204.
- Micke, P., Beeh, K.M., Schlaak, J.F., Buhl, R. (2001). Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 171–178.
- Mikawa, K., Kodama, S.I., Nishina K., Obara. H. (2001). ONO-1714, a new inducible nitric oxide synthase inhibitor, attenuates diaphragmatic dysfunction associated with cerulein-induced pancreatitis in rats. *Crit. Care Med.* 29, 1215–1221.
- Miles, M.P., Pearson, S.D., Andring, J.M., Kidd, J.R., Volpe, S.L. (2007). Effect of carbohydrate intake during recovery from eccentric exercise on interleukin-6 and muscle-damage markers. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 17, 507–520.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Copinathan, V., Milner, A. (1993). A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-412.
- Miller, S.L., Tipton, K.D., Chinkes, D.L., Wolf, S.E., and Wolfe, R.R. (2003). Independent and combined effects of amino acids and glucose after resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 449–455.
- Millward, D.J., Pacy, P.J. (1995). Postprandial protein utilization and protein quality assessment in man. *Clin. Sci. (Lond)* 88, 597-606.
- Miquel, J., Romano-Bosca, A. (2004). Oxidative stress and antioxidant diet supplementation in ageing, arterosclerotic and immune dysfunction processes. *ARS Pharm.* 45, 91-109.

- Mitchell, J.B., Costill, D.L., Houmard, J.A., Flynn, M.G., Fink, W.J., Beltz, J.D., (1990). Influence of carbohydrate ingestion on counterregulatory hormones during prolonged exercise. *Int. J. Sports Med.* 11, 33–36.
- Moldawer, L.L., Copeland, E.M. III (1997). Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer.* 79, 1828-1839.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.
- Muralikrishna Adibhatla, R., Hatcher, J.F. (2006). Phospholipase A2, reactive oxygen species, lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 376–387.
- Murray, R., Paul, G.L., Seifent, J.G., Eddy, D.E. (1991). Responses to varying rates of carbohydrate ingestion during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23, 713–718.
- Mylonas, C, Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13, 295-309.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshiba, N., Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* 43, 30S-34S.
- Natarajan, V. (1993). Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J. Lab. Clin. Med.* 125, 26-37.
- Nethery, D., Callahan, L.A., Stofan, D., Mattera, R., DiMarco, A., Supinski, G. (2000). PLA2 dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Appl. Physiol.* 89, 72–80.
- Neuzil, J., Gebicki, J.M., Stocker, R. (1993). Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem. J.* 293, 601–606.
- Newsholme, E., Blomstrand, E., Ekblom, B. (1992). Physical and mental fatigue: Metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. *Brit. Med. Bul.* 48, 477-495.
- Nguyen, T., Sherrat, P.J., Pickett, C.B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233–260.
- Nieman, D.C. (1998). Exercise and resistance to infection. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 573-580.

- Nieman, D.C., Davis, J.M., Henson, D.A., Gross, S.J., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Carson, J.A., Brown, A., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Triplett, N.T. (2005). Muscle cytokine mRNA changes after 2.5 h of cycling: influence of carbohydrate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 1283–1290.
- Nieman, D.C., Davis, J.M., Henson, D.A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Carson, J.A., Brown, A., Lee, W.J., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S. (2003). Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3 h run. *J. Appl. Physiol.* 94, 1917–1925.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Opiela, S.J., Morrow, J.D. (2002). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J. Appl. Physiol.* 92, 1970–1977.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Smith, L.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Davis, J.M., Nieman, D.C., Peters, E.M., Henson, D.A., Nevines, E.I., Thompson, M.M. (2000). Influence of vitamin C supplementation on cytokine changes following an ultramarathon. *J. Interf. Cytok. Res.* 20, 1029–1035.
- Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y., Tsuchiya, J., Kamiya, Y. (1985). Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* 25, 2191–2196.
- Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Kouretas, D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 38, 579–606.
- Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A.Z., Kouretas, D. (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 197–205.
- Niles, E.S., Lachowetz, T., Garfi, J., Sullivan, W., Smith, J.C., Leyh, B.P., Headley, S.A. (2001). Carbohydrate–protein drink improves time to exhaustion after recovery from endurance exercise. *J. Exerc. Phys.* 4, 45–52.
- Nishiya, K., Horwitz, D.A. (1982). Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibodydependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 129, 2519–2523.
- Nosaka, K., Lavender, A., Newton, M., Sacco, P. (2003). Muscle damage in resistance training. *Int. J. Sport Health Sci.* 1: 1–8.



- O'Keeffe, M.B., FitzGerald, R.J. (2014). Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cell. *Int. Dairy J.*, 36, 128-135.
- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., Orelund, L. (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res.* 906, 170-175.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457-464.
- on plasma interleukin-6, hepcidin and iron concentrations following prolonged exercise. *Cytokine.* 50, 182-188.
- Osburn, W.O., Kensler, T.W. (2008). Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31-39.
- Ostdal, H., Andersen, H.J., Davies, M.J. (1999). Formation of long-lived radicals on proteins by radical transfer from heme enzymes—a common process? *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 105-112.
- Ozhogina, O.A., Kasaikina, O.T.  $\beta$ -carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 575-581.
- 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.
- Panzenbock, U., Stocker, R. (2005). Formation of methionine sulfoxidecontaining specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1703, 171-181.
- Parham, P. (2000). The immune system, Chapter 1. Elements of the immune systems and their roles in defense. New York: Garland Publishing., pp. 1-31.
- Park, E.Y., Murakami, H., Mori, T., Matsumura, Y. (2005). Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J. Agr. Food Chem.* 53, 137-144.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357, 83-86.
- Pattwell, D.M., McArdle, A., Morgan, J.E., Patridge, T.A., Jackson, M.J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1064-1072.
- Payne, K.D., Davidson, P.M., Olive, S.P. (1990). Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53, 468-472.

- Peake, J.M., Suzuki, K., Hordern, M., Wilson, G., Nosaka, K., Coombes, J.S. (2005a). Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur. J. Appl. Physiol.* 95, 514-521.
- Pedersen, B.K. (2000). Exercise and cytokines. *Immun. Cell Biol.* 78, 532–535.
- Pedersen, B.K., Edward, F., 2009. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J. Appl. Physiol.* 107, 1006–1014.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Wolsk-Petersen, E., Febbraio, M. (2004). The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc. Nutr. Soc.* 63, 263–267.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Ostrowski, K., Schjerling, P. (2001). Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exerc.*
- Pen˜a-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. (2003). Whey and soy protein inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci.* 64, 259–263.
- Petersen, A.M., Pedersen, B.K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 98, 1154–1162.
- Petersen, E.W., Ostrowski, K., Ibfelt, T., Richelle, M., Offord, E., Halkjaer-Kristensen, J., Pedersen, B.K. (2001). Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am. J. Physiol.* 280, C1570-C1575.
- Peterson, J.M., Trappe, T.A., Mylona, E., White, F., Lambert, C.P., Evans, W.J., Pizza, F.X. (2003). Ibuprofen and acetaminophen: effect on muscle inflammation after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 892-896.
- Petrone, W.F., English, D.K., Wong, K., McCord, J.M. (1980). Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77,1159-1163.
- Phaneuf, S., Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, 393–396.
- Piccolomini, A.F., Iskandar, M.M., Lands, L.C., Kubow, S. (2012). High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food Nutr. Res.* 56.
- Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, Maes, P., tartar, A., Montreuil, J., Spik, G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196, 177-184.
- Poss, K.D., Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 10925–10930.

- Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88, 1243–1276.
- Powers, S.K., Lennon, S.L. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 1025-1033.
- Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27,1173-1181.
- Pryor, W.A., Jin, X., Squadrito, G.L. (1994). One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 11173– 11177.
- Pryor, W.A., Squadrito, G.L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268, 699–722.
- Pyne, D.B. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.* 17, 245-258.
- Raastad, T., Risoy, B.A., Benestad, H.B., Fjeld, J.G., Hallen, J. (2003). Temporal relation between leukocyte accumulation in muscles and halted recovery 10-20 h after strength exercise. *J. Appl. Physiol.* 95, 2503-2509.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., nyakas, C., Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 69-74.
- Rav, R.S., Mehrotra, S., Shanker, U., Babu, G.S., Joshi, P.C., Hanss, R.K. (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem. Toxicol.* 24, 191-200.
- Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., & Massaro, E.J. (1982). Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci.* 31, 571–576.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. (2004). Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Reid, M.B. (2001). Plasticity in skeletal, cardiac and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90, 724-731.
- Reid, M.B., Haack, K.E., Franchek, K.M., Valberg, P.A., Kobzik, L., West, M.S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 73, 1797–1804.

- Renke, J., Popadiuk, S., Korzon, M., Bugajczyk, B., Wozniak, M. (2000). Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 101-104.
- 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.
- Rhee, S.G. (2006). Cell signaling: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 312, 1882-1883.
- 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.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G., Wichers, H.J, (2001). Caseins and casein hydrolysates. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agr. Food. Chem.* 49, 295–302
- Robson-Ansley, P., Walshe, I., Ward, D. (2011). The effect of carbohydrate ingestion on plasma interleukin-6, hepcidin and iron concentrations following prolonged exercise. *Cytokine.* 50, 182–188.
- Rodriguez NR, DiMarco NM, Langley S. Joint position statement: nutrition and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41: 709-31.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood.* 90, 909-928.
- Rosaneli, C.F., Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Carvalho, J.E., Sqarbieri, V.C. (2002). Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *J. Med. Food.* 5, 221-228.
- Rowlands, D.S., Rossler, K., Thorp, R.M., Graham, D.F., Timmons, B.W., Stannard, S.R., Tarnopolsky, M.A. (2008). Effect of dietary protein content during recovery from high-intensity cycling on subsequent performance and markers of stress, inflammation, and muscle damage in well-trained men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33, 39–51.
- Rushmore, T.H., Pickett, C.B., (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene: characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 14648–14653.
- Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agr. Food Chem.* 51, 3661–3667.

- Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., Tomita, M. (1991). Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Sci.* 74, 3724-3730.
- Sastre, J., Asensi, M., Gascó, E., Pallardó, F.V., Ferrero, J.A., Furukawa, T., Viña, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.* 263, R992-R995.
- Saunders, M., Kane, M., Todd, K. (2004). Effects of a carbohydrate–protein beverage on cycling endurance and muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36, 1233–1238.
- Saunders, M.J., Luden, N.D., Herrick, J.E. (2007). Consumption of an oral carbohydrate–protein gel improves cycling endurance and prevents postexercise muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* 21, 678–684.
- Sawatzki, G., Rich, I.N. (1989). Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cells* 15, 371-385.
- Sayers, S.P., Clarkson, P.M. (2003). Short-term Immobilization after eccentric exercise. Part O†: Creatine kinase and myoglobin. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 762-768.
- Scharhag, J., Meyer, T., Auracher, M., Gabriel, H.H., Kindermann, W. (2006). Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 286–292.
- Schneider, B.S., Tiidus, P.M. (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med.* 37, 837–856.
- Schreibelt, G., van Harssen, J., van Rossum, S., Dijkstra, C.D., Drukarch, B., de Vries, H.E., (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res. Rev.* 2, 322–330.
- Sekine, K., Watanabe, E., Nakamura, J., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Kim, D.J., Asamoto, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M.A., Nishino, H., Kakizoe, T.(1998). Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 523-526.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, 368-370.
- Sen, C.K., Atalay, M., Hanninen, O. (1994). Exerciseinducedoxidative stress: glutathione supplementationand deficiency. *J. Appl. Physiol.* 77, 2177-2187.
- Sen, C.K., Packer, I. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709-720.
- Sevanian, A., Davies, K.J., Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1129S-1134S.

- Shah, N.P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br. J. Nutr.* 84, S3-S10.
- Shah, N.P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br. J. Nutr.* 84, S3-S10.
- Shi, H., DiRienzo, D., Zemel, M.B. (2001). Effects of dietary calcium on adipocytelipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J.* 15, 291–293.
- Sies, H., Summer, K.H. (1975). Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 57, 503-512.
- Silverwood, B. (2003). Building healthy bones. *Paediatr. Nurs.* 15, 27-29.
- Sjodin, B, Hellsten Westing, Y., Apple, F.S. (1990). Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*, 10, 236-254.
- Smith, J.A., Gray, A.B., Pyne, D.B., Baker, M.S., Telford, R.D., Weidemann, M.J. (1996). Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am. J. Physiol.* 270, R838–R845.
- Smith, L., Anwar, A., Fragen, M., Rananto, C., Johnson, R., Holbert, D. (2000). Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82, 61-67.
- Smithers, G.W., McIntosh, G.H., Regester, G.O., et al. Johnson, M.A., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Jelen, P. (1998). Anti-cancer effects of dietary whey proteins. *Proceedings of the Second International Whey Conference* 9804, 306-309.
- Soares, M.P., Brouard, S., Smith, R.N., Bach, F.H. (2001). Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol. Rev.* 184, 275–285.
- Sons (Ed.), *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group.
- Stadtman, E.R. (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* 11, 11-12.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191-208.
- Stadtman, E.R., Moskovitz, J., Levine, R.L. (2003b). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 577–582.
- Starkie, R.L., Angus, D.J., Rolland, J., Hargreaves, M., Febbraio, M.A. (2000). Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J. Physiol.* 528, 647–655.

- Starkie, R.L., Arkinstall, M.J., Koukoulas, I., Hawley, J.A., Febbraio, M.A. (2001). Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *J. Physiol.* 533, 585–591.
- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., Klarlund, P.B. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol.* 529, 237–242.
- Steijns, J.M., van Hooijdonk, A.C. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 84, S11-S17.
- Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 841–849.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235, 1043–1046.
- Stupka, N., Tarnopolsky, M.A., Yardley, N.J., Phillips, S.M. (2001). Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 91, 1669-1678.
- Sukkar, S. G., Bounous, G. (2004). The role of whey protein in antioxidant defense. *Rivista Italiana di Nutrizione Parenterale ed Enterale.* 22, 193–200.
- Sumpio, B.E, Riley, J.T, Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508-1512.
- Sundberg, J., Ersson, B., Lonnerdal, B., Oskarsson, A. (1999). Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man – a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicol.* 137, 169-184.
- Supinski G.S., L.A. Callahan, L.A. (2006). Polyethylene glycol-superoxide dismutase prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 1240–1247.
- Supinski, G., Nethery, D., Nosek, T.M., Callahan, L.A., Stofan D., DiMarco, A. (2000). Endotoxin administration alters the force vs. pCa relationship of skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R891–896.
- Supinski, G., Stofan, D., Callahan, L.A., Nethery, D., Nosek, T.M., DiMarco, A. (1999). Peroxynitrite induces contractile dysfunction and lipid peroxidation in the diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 87, 783–791.
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Liu, Q., Kurakake, S., Okamura, N., Kumae, T., Umeda, T., Sugawara, K. (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med. Sci. Sports Exer.* 35, 348-355.
- Suzuki, K., Ohno, H., Oh-ishi, S., Kizaki, T., Ookawara, T., Fukii, J., Radak, A., Taniguchi, N. (2000). Superoxide dismutases in exercise and disease. In: *Handbook of*

*Oxidants and Antioxidants and Exercise*, edited by Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier, 2000, pp. 243–295.

- Suzuki, K., Totsuka, M., Nakaji, S., Yamada, M., Kudoh, S., Liu, Q., Sugawara, K., Yamaya, K., Sato, K. (1999). Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 87, 1360-1367.
- Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S., Okamura, N., Yamaya, K., Liu, Q., Kudoh, S., Kowatari, K., Nakaji, S., Sugawara, K. (2000). Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 281-287.
- Suzuki, T., Yamauchi, K., Kawase, K., Okonogi, S., Tomita, M. (1990). Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *E. coli*. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1705-1706.
- Svensson, M.B., Ekblom, B., Cotgreave, I.A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., Sjodin, B., Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.* 176, 43-56.
- Swain, J.H., Alekel, D.L., Dent, S.B., Peterson, C.T., Reddy, M.B. (2002). Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 165–171.
- Szweda, P.A., friguets, B., Szweda, L.I. (2002). Proteolysis, free radicals and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 29-36.
- Takada Y, Kobayashi N, Kato K, Matsuyama, H., Yahiro, M., Aoe, S. (1997). Effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 43, 199-210.
- Takada, Y., Aoe, S., Kumegawa, M. (1996). Whey protein stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 445-449.
- Takada, Y., Kobayashi, N., Matsuyama, H., Kato, K., Yamamura, J., Yahiro, M., Kumegawa, M., Aoe, S. (1997). Whey protein suppresses the osteoclast mediated bone resorption and osteoclast cell formation. *Int. Dairy. J.* 7, 821-825.
- Talalay, P., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D. (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv.Enzyme Regul.* 43, 121–134.
- Tanizawa, H., Ohkava, Y., Takino, Y., Miyase, T., Ueno, A., Kageyama, T., Hara, S. (1992). Studies on natural antioxidants in citrus species. I.Determination of antioxidative activities of citrus fruits. *Chem.Pharm. Bull.* 40, 1940-1942.



- Tessier, F., Margaritis, I., Richard, M.J., Moynot, C., Marconnet, P. (1995). Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27, 390-396.
- therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 28, 141–143.
- Tidball, J.G. (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27, 1022-1032.
- Tipton, K.D., and Wolfe, R.R. (2004). Protein and amino acids for athletes. *J. Sports Sci.* 22, 65–79.
- Toba Y, Takada Y, Yamamura J, Tanaka, M., Matsuoka, Y., Kawakami, H., Itabashi, A., Aoe, S., Kumegawa, M. (2000). Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone.* 27, 403- 408.
- Toba, Y., Takada, Y., Matsuoka, Y., Morita, Y., Motouri, M., Hirai, T., Suguri, T., Aoe, S., Kawakami, H., Kumegawa, M., Takeuchi, A., Itabashi, A. (2001). Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1353-1357.
- Toft, A.D, Jensen, L.B, Bruunsgaard, H., Ibfelt, T., Halkjaer-Kristensen, J., Febbraio, M., Pedersen, B.K. (2002). Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am. J. Physiol.* 283, C289-C295.
- Tome, D., Bos, C. (2000). Dietary protein and nitrogen utilization. *J. Nutr.* 130, 1868S-1873S.
- Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi, S., Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 80, 109-112.
- Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1473–1478.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57, 145–155.
- Tracey P., Childs, A.C., Dreon, D.M., Phinney, S., Leeuwenburgh, C. (2003). A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 2032-2032.
- 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.
- Tsuda, H., Sekine, K., Nakamura, J., ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., kim, D.J., Asamoto, M., Baba-Toriyama, H., moore, M.A., Nishino, H., Kakizoe, T. (1998).

- Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443, 273-284.
- Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Han, B.S., Moore, M.A. (2000). Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutat. Res.* 462, 227- 233.
- Tsuji-naito, K., Jack, R.W. (2012). Concentrated bovine milk whey active proteins facilitate osteogenesis through activation of the JNK-ATF4 pathway. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 76(6), 1150-1154.
- Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1685-1696.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 39, 44–84.
- Van, M.F.L., Kuiperij, H.B., (2005). The Nrf2-ARE signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Curr. Drug. Targets. CNS Neurol. Disord.* 4, 267–281.
- Vary, T.C., Deiter, G., Lang, C.H. (2004). Diminished ERK 1/2 and p38 MAPK phosphorylation in skeletal muscle during sepsis. *Shock.* 22, 548–554.
- Vasankari, T., Kujala, U., Ahotupa, S.M. (1998). Effects of ascorbic acid and carbohydrate ingestion on exercise induced oxidative stress. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 38, 281–285.
- Vasankari, T.J., Kujal, U.M., Vasankari, T.M., Vuorimaa, T., Ahotupa, M. (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 509-513.
- Victoria, K. (1994). Review on the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat. Res.* 317, 43-55.
- Vider, J., Lehtmaa, J., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Zilmer, K., Kairane, C., Landor, A., Karu, T., Zilmer, M. (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology.* 7, 263-270.
- Villiere, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., Genot, C. (2005). Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1514–1520.
- Volbracht, C., Chua, B.T., Ng, C.P., Bahr, B.A., Hong, W., Li, P. (2005). The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J. Neurochem.* 93,1280–1292.

- Von Sonntag, C. (1987). *The Chemical Basis of radiation Biology*. Taylor & Francis, London.
- 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.
- Wayner, D.D., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R., Locke, S.J. (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, 408-419.
- Wedworth, S.M., Lynch, S. (1995). Dietary flavonoids in arterosclerosis prevention. *Ann. Pharmacother.* 29, 627-628.
- Weinberg, E.D. (1996). The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 19-36.
- Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J., Wong, A.W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol. Sci.* 108, 4-18.
- Westerblad, H., Bruton, J.D., Katz, A. (2010). Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp. Cell Res.* 316, 3093-3099.
- 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.
- Witt, E.H., Reznick, A.Z., Viquie, C.A., Starke-Reed, P., Packer, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* 122, 766-773.
- Wolf, M., Bohm, S., Brand, M., Kreymann, G. (1996). Proinflammatory cytokines interleukin 1 beta and tumor necrosis factor inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *Eur. J. Endocrinol.* 135, 729-73.
- Wood, L.J., Nail, L.M., Winters, K.A., 2009. Does muscle-derived interleukin-6 mediate some of the beneficial effects of exercise on cancer treatment-related fatigue? *Oncol. Nurs. Forum.* 36, 519-524.
- Wormser, U., Sintov, A., Brodsky, B., Nyska, A. (2000). Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 33-39.

- Woywodt, A., Bahlmann, F.H., De Groot, K., Haller, H., Haubitz, M. (2002). Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephro. Dial. Transplant.* 17, 1728-1730.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134, 489–492.
- Xia, R., Webb, J.A., Gnall, L.L., Cutler, K., Abramson, J.J. (2003). Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C215–C221.
- Xu, R., Liu, N., Xu, X., Kong, B. (2011). Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J. Dairy Sci.* 94, 3739–3746.
- Yamamura, J., Aoe, S., Toba, Y., Motouri, M., Kawakami, H., Kumegawa, M., Itabashi, A., Takada, Y. (2002). Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 702-704.
- Yamauchi, K. (1992). Biologically functional proteins in milk and peptides derived from milk proteins. *Bull. Int. Dairy Fed.* 272, 51-58.
- Yamaya, K., Sato, K. (1999). Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 87, 1360-1367.
- Yang YM, Noh K, Han CY, Kim, S.G. (2010). Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules.* 15, 6332–6348.
- Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim. Pol.* 50, 319–336.
- Yen, G.C., Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J. Agricult. Food Chem.* 42, 629–632.
- 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.
- Yoo, Y.C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K., Azuma, I. (1998). Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443, 285-291.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139–162.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agricult. Food Chem.* 50, 1619–1624.

- Zemel, M.B. (2003). Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J. Nutr.* 133, 252S-256S.
- Zemel, M.B., Shi, H., Greer, B., DiRienzo, D., Zemel, P.C. (2000). Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 14, 1132-8.
- Zemel, M.B., Thompson, W., Zemel, P., Nocton, A.M., Milstead, A., Morris, K., Campbell, P. (2002). Dietary calcium and dairy products accelerate weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 2S-342S.
- Zhao, X., Bey, E.A., Wientjes, F.B., Cathcart, M.K. (2002). Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity. cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67(phox) and p47(phox). *J. Biol. Chem.* 277, 25385-25392.
- Zuo, L., Christofi, F.L., Wright, V.P., Bao, S., Clanton, T.L. (2004). Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 97, 661-668.
- Zuo, L., Christofi, F.L., Wright, V.P., Liu, C.Y., Merola, A.J., Berliner, L.J., Clanton, T.L. (2000). Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1058 - C1066.



## Effect of a special carbohydrate–protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans

Efthalia Kerasiotti<sup>a</sup>, Alexandra Kiskini<sup>a</sup>, Aristidis Veskoukis<sup>a</sup>, Athanasios Jamurtas<sup>d</sup>, Christina Tsitsimpikou<sup>b</sup>, Aristidis M. Tsatsakis<sup>c,\*</sup>, Yiannis Koutedakis<sup>d,e,f</sup>, Dimitrios Stagos<sup>a</sup>, Demetrios Kouretas<sup>a,\*</sup>, Vaios Karathanos<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry-Biotechnology, University of Thessaly, Larisa 41221, Greece

<sup>b</sup>General Chemical State Laboratory of Greece, 16 An. Tsocha Str., Athens 11521, Greece

<sup>c</sup>Department of Forensic Sciences and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71409, Greece

<sup>d</sup>Department of Exercise and Sport Sciences, University of Thessaly, Trikala 42100, Greece

<sup>e</sup>School of Sport, Performing Arts and Leisure, University of Wolverhampton WS1 3BD, UK

<sup>f</sup>Institute of Human Performance and Rehabilitation, Trikala 42100, Greece

<sup>g</sup>Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, 70 El. Venizelou Kallithea, Athens 17671, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2012

Accepted 7 April 2012

Available online 17 April 2012

#### Keywords:

Oxidative stress

Exercise

Blood

Carbohydrate–protein cake

### ABSTRACT

Exercise has been associated with oxidative stress that is correlated with muscle fatigue and reduced exercise performance. The aim of this study was to examine the effects of a special cake (consisting of carbohydrate to whey protein 3.5:1) vs an isocaloric carbohydrate cake on biomarkers of oxidative stress in 9 males after exhaustive cycling. A randomized single-blind cross-over study was completed. They performed one trial involving a 2-h exercise on a cycle ergometer at 60–65%  $\dot{V}O_2$ max followed by a 4-h recovery and then a second trial involved an 1-h exercise at 60–65%  $\dot{V}O_2$ max which was increased at 95%  $\dot{V}O_2$ max (time trial). The subjects received 4 experimental or placebo cakes after the first trial (the first immediately after and then one every hour). Blood samples were collected at eight time intervals: pre-exercise, 30 min, 1.5 h and 4 h post-exercise, post time Trial, 1 h, 24 h and 48 h post time Trial. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), protein carbonyls, total antioxidant capacity (TAC), catalase and glutathione (GSH) were determined spectrophotometrically. The mean time to exhaustion did not differ upon cake consumption. Consumption of the special cake reduced TBARS significantly, but had no effect on other oxidative stress markers.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; CV, coefficients of variation; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; DPPH•, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; DPPH•H, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine; DTNB, 5,5'-dithiobis-2 nitrobenzoate; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; GSH, glutathione; Hb, hemoglobin; HCl, hydrochloride; Hct, hematocrit;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; MCV, mean cell volume; Plt, platelets; RBC, red blood cells; RPE, rating of perceived exertion; TAC, total antioxidant capacity; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TCA, trichloroacetic acid; Tris-HCl, tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride; WBC, white blood cells.

\* Corresponding authors. Department of Forensic Sciences and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71409, Greece. Tel.: +30 2810394679; fax: +30 2810542098 (A.M. Tsatsakis). Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aioulou St., Larissa 41221, Greece. Tel.: +30 2410 565277; fax: +30 2410 565290 (D. Kouretas).

E-mail addresses: e-fthalia@hotmail.com (E. Kerasiotti), alexkisk@gmail.com (A. Kiskini), veskoukis@gmail.com (A. Veskoukis), ajamurt@pe.uth.gr (A. Jamurtas), chtsits@yahoo.com (C. Tsitsimpikou), aris@meduoc.gr, tsatsaka@uoc.gr (A.M. Tsatsakis), ykoutedakis@pe.uth.gr (Y. Koutedakis), stagkos@med.uth.gr (D. Stagos), dkouret@uth.gr (D. Kouretas), vkarath@hua.gr (V. Karathanos).

0278-6915/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.015>

### 1. Introduction

It is well established that exercise induces excessive production of reactive species. An amount of reactive species is necessary for physiological processes, namely signal transduction (Ji, 2007; Wells et al., 2009), gene expression (Ji et al., 2006) and useful adaptations during exercise (Gomez-Cabrera et al., 2005). However, excessive production of reactive species leads to oxidative stress, which has been implicated in oxidative damage of macromolecules (Veskoukis et al., 2008), immune dysfunction (Schneider and Tiidus, 2007), muscle damage (Nikolaidis et al., 2007) and fatigue (Bettors et al., 2004). It has also been observed that muscle-damaging exercise also induces oxidative stress and its detrimental effects last for a few days after the end of it (Nikolaidis et al., 2008; Urso et al., 2003). Therefore, recovery of athletes after severe exercise could be slow and athletic performance is usually not optimal. Several investigators have tried to improve athletic performance via supplementation of beverages rich in carbohydrates and proteins, sometimes wiley with contradictory effects on

performance (Baty et al., 2007; Betts et al., 2007; Ferguson-Stegall et al., 2010; Haff et al., 2000; Ivy et al., 2002). To the authors' knowledge, solid or other than liquid forms of supplementation upload have not been studied in the literature.

Milk has been recently recognized as functional food, suggesting that its constituents have direct and measurable effects on health (Nagendra, 2000). Its main sources of protein are caseins and whey. After cheese manufacturing, caseins are the proteins responsible for making curds, while whey remains in an aqueous environment. The components of whey include beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins, lactoperoxidase enzymes, glycomacropeptides and lactose (Madureira et al., 2007; Walzem et al., 2002). Whey is considered as by-product of cheese manufacturing, but it is also described as functional food (Marshall, 2004; Morr and Ha, 1993), as it is involved in preventing or improving several pathogenic conditions. Whey is a dietary supplement providing antimicrobial activity, immune modulation and seems to participate in the prevention of cardiovascular diseases (Marshall, 2004). It contains high concentration of branched-chain amino acids such as leucine, isoleucine and valine, which play a key role in protein metabolism and are important factors in muscle hypertrophy (Ha et al., 2003) and strength, in tissue growth and repair (Anthony et al., 2001). Whey is also rich in sulfur-containing cysteine and methionine, which contribute to the enhancement of antioxidant defence through intracellular conversion to glutathione (Marshall, 2004).

Relative studies of the literature usually examine the effects of the supplementation of liquid beverages rich in carbohydrates or proteins on performance. However, studies investigating the effects of carbohydrates and proteins administered in other forms than liquid on oxidative stress are lacking. The main objective of the present study was to examine the effects of a special cake consisted of a specific ratio of carbohydrates and whey protein on oxidative stress in athletes after exhaustive exercise.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Nine physically active men (age,  $28 \pm 2$  yr; height,  $184 \pm 3$  cm; weight,  $77 \pm 2$  kg; body fat,  $11 \pm 2\%$ ; body mass index,  $23 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup>,  $\dot{V}O_{2\max}$ ,  $4.1 \pm 0.2$  L/min mean  $\pm$  SEM) participated in the present study. The subjects were training at least 3 times per week for at least 3 h and had a training history of at least 2 years. They were nonsmokers and were not receiving anti-inflammatory medication or nutritional supplements.  $\dot{V}O_{2\max}$  measurement ensured that the subjects exercised at similar intensities. A written informed consent to participate in the study was provided by all participants after they had been informed of all risks, discomforts and benefits involved in the study. The procedures were in accordance with the Helsinki declaration of 1975 and approval was received by the human subjects committee of the University of Thessaly.

The subjects visited the laboratory for the first time for a screening of anthropometric parameters and they completed a health and activity questionnaire. Each participant reported to the laboratory in the morning after an overnight fast and abstained from alcohol and caffeine for 24 h. Body mass was measured to the nearest 0.5 kg (Beam Balance 710, Seca, UK) with the subjects lightly dressed and barefoot. Standing height was measured to the nearest 0.5 cm (Stadiometer 208, Seca). Percentage body fat was calculated from seven skinfold measures (average of two measurements of each site), using a Harpenden caliper (John Bull, UK), according to published guidelines (American College of Sports Medicine, 2000). Body mass index was calculated as the ratio of body weight (kg)/height (m<sup>2</sup>).  $\dot{V}O_{2\max}$  was determined after a maximal consumption test on a cycle ergometer (Monark 834E, Sweden) was performed. The protocol began at 1.5 kg (-70RPM) for 1 min and was increased by 0.5 kg every 2 min until  $\dot{V}O_{2\max}$  was reached. Respiratory gas variables were measured using a metabolic cart (Vmax29; SensorMedics, USA), which was calibrated before each test using standard gases of known concentration. Exercise heart rate was monitored by telemetry (Polar Tester, S610TM, Electro Oy, Finland).

### 2.2. Diet and activity before the experiment

The subjects were instructed to follow their usual eating habits during the days before the experiment. They were also asked to record on a dietary record sheet their diet 3 days before the first exercise bout and for 2 days after it. All volunteers

were instructed to stay away from strenuous physical activity for 2 days preceding and 2 days following the experiment. The subjects received a copy of their dietary record sheets and were asked to follow exactly the same food intake patterns (as recorded in their dietary record sheets) before their second experimental session.

### 2.3. Design

Each subject participated in two trials in a counterbalanced fashion (same subjects received both the experimental cake and placebo cake in a random order) using a crossover, double-blind, repeated-measures design. The subjects visited the laboratory for a second time 5 days after their  $\dot{V}O_{2\max}$  determination (08:00–09:00 h in the morning) and were participated either in the experimental or placebo trial. Each subject participated in two experimental sessions separated with wash out period of one week. During each session the subjects consumed either an experimental cake providing 0.9 g carbohydrate/kg body weight/h and 0.28 g protein/kg body weight/h, providing a ratio between carbohydrates and whey protein of 3.5:1, or a placebo cake providing 1.1 g carbohydrate/kg body weight/h and 0.1 g protein/kg body weight/h. The experimental protocol consisted of the following phases: (I) 2 h of continuous cycling on cycle ergometer (Monark 834E, Sweden) at an intensity corresponding to 60–65% of their established  $\dot{V}O_{2\max}$ , (II) 4 h of recovery, (III) 1 h of continuous cycling at 60–65% of their  $\dot{V}O_{2\max}$ , (IV) cycling speed was increased to 95% of their  $\dot{V}O_{2\max}$  until exhaustion (time Trial), (V) 1 h of recovery (Fig. 1). Exercise was performed at a temperature of  $21 \pm 2$  °C and  $45 \pm 4\%$  relative humidity. To attenuate subjects' discomfort, water was available *ad libitum* throughout the experiment and its consumption was recorded. Expired gas samples were collected every 15 min to ensure the prescribed exercise intensity. Perceived fatigue of the subjects was recorded every 15 min using Borg scale during phases I and III and at the end of phase IV. Blood samples were collected pre exercise (T1), 30 min post exercise (T2), 1.5 h post exercise (T3), 4 h post exercise (T4), immediately post time Trial (T5), 1 h post time Trial (T6), 24 h post time Trial (T7) and 48 h post time Trial (T8) (Fig. 1). One experimental or placebo cake was consumed by the subjects immediately post exercise and three more experimental or placebo cakes were consumed every 1 h after the first one. Exercise testing, cake administration and blood sampling was repeated at the same time of day and in the same order before and after the first trial (experimental, Fig. 1A) as well as before and after the second trial (placebo, Fig. 1B).

### 2.4. Fat and carbohydrate oxidation

Fat and carbohydrate oxidation rates (g min<sup>-1</sup>) during submaximal exercise were calculated indirectly by monitoring the rate of O<sub>2</sub> consumption (L min<sup>-1</sup>) and CO<sub>2</sub> production (L min<sup>-1</sup>) using the following stoichiometric equations (Jeukendrup and Wallis, 2005), assuming that protein oxidation during exercise was negligible:

$$\text{fat oxidation} = 1.695\dot{V}O_2 - 1.701\dot{V}CO_2$$

$$\text{carbohydrate oxidation} = 4.210\dot{V}CO_2 - 2.962\dot{V}O_2$$

### 2.5. Blood collection and handling

Blood samples (10 mL) were drawn from a forearm vein with subjects in a seated position. Blood was collected in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes, centrifuged immediately at 1370 g for 10 min at 4 °C and the plasma was collected and used for the measurement of TAC and the determination of TBARS and protein carbonyl concentrations. The packed erythrocytes were lysed with distilled water (1:1 v/v), inverted vigorously, centrifuged at 4020 g for 15 min at 4 °C and the erythrocyte lysate was collected for measurement of catalase activity. A portion of erythrocyte lysate (500 µL) was treated with 5% trichloroacetic acid (TCA) (1:1 v/v), vortexed vigorously, and centrifuged at 28,000g for 5 min at 4 °C. The supernatants were removed, treated again with 5% TCA (1.3:1 v/v) and centrifuged again at 28,000g for 5 min at 4 °C. The clear supernatants were transferred to eppendorf tubes and were used for the determination of GSH concentration. A blood aliquot (1 mL) was immediately mixed with EDTA to prevent clotting for hematology. Plasma and erythrocyte lysate were then stored at -80 °C until biochemical analyses.

### 2.6. Assays

For TBARS determination, a slightly modified assay of Keles et al. (2001) was used. According to this method, 100 µL of plasma was mixed with 500 µL of 35% TCA and 500 µL of tris(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)hydrochloride (Tris-HCl) (200 mM, pH 7.4) and incubated for 10 min at room temperature. One milliliter of 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 55 mM thiobarbituric acid solution was added and the samples were incubated at 95 °C for 45 min. The samples were cooled on ice for 5 min and were vortexed after adding 1 mL of 70% TCA. The samples were centrifuged at 15,000g for 3 min and the absorbance of the supernatant was read at 530 nm. A baseline absorbance was taken into account by running a blank along with all samples during the measurement. Calculation of TBARS concentration was based on the molar extinction coefficient of malondialdehyde. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for TBARS were 3.9% and 5.9%, respectively.



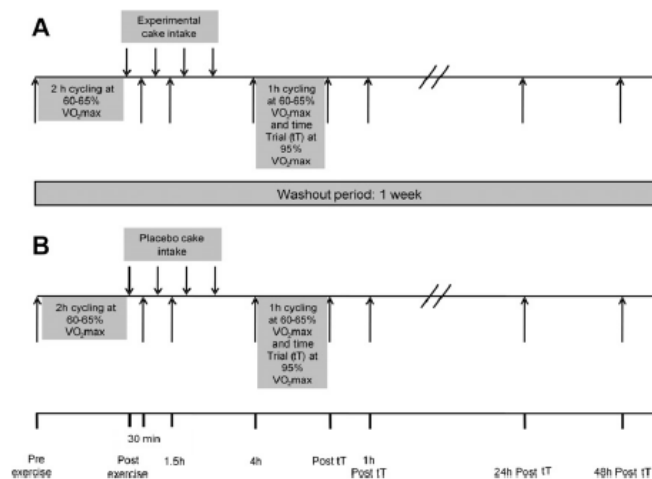


Fig. 1. Experimental Design. Downward arrows indicate time of experimental (A) or placebo (B) cake intake. Upward arrows indicate time of blood sampling.

Protein carbonyls were determined based on the method of Patsoukis et al. (2004). In this assay, 50  $\mu$ L of 20% TCA was added to 50  $\mu$ L of plasma and this mixture was incubated in an ice bath for 15 min and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4  $^{\circ}$ C. The supernatant was discarded and 500  $\mu$ L of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [in 2.5 N hydrochloric acid (HCl)] for the sample, or 500  $\mu$ L of 2.5 N HCl for the blank, was added to the pellet. The samples were incubated in the dark at room temperature for 1 h, with intermittent vortexing every 15 min and were centrifuged at 15,000g for 5 min at 4  $^{\circ}$ C. The supernatant was discarded and 1 mL of 10% TCA was added, vortexed and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4  $^{\circ}$ C. The supernatant was discarded and 1 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1 v/v) was added, vortexed and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4  $^{\circ}$ C. This washing step was repeated twice. The supernatant was discarded and 1 mL of 5 M urea (pH 2.3) was added, vortexed and incubated at 37  $^{\circ}$ C for 15 min. The samples were centrifuged at 15,000g for 3 min at 4  $^{\circ}$ C and the absorbance was read at 375 nm. Calculation of protein carbonyl concentration was based on the molar extinction coefficient of DNPH. The intra- and inter-assay CV for protein carbonyls were 4.3% and 7.0%, respectively. Total plasma protein was assayed using a Bradford reagent from Sigma-Aldrich.

GSH was measured according to Reddy et al. (2004). Twenty microliters of erythrocyte lysate treated with 5% TCA were mixed with 660  $\mu$ L of 67 mM sodium potassium phosphate (pH 8) and 330  $\mu$ L of 1 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB). The samples were incubated in the dark at room temperature for 45 min and the absorbance was read at 412 nm. GSH concentration was calculated on the basis of calibration curve made using commercial standards. The intra- and inter-assay CV for GSH were 3.1% and 4.5%, respectively.

Catalase activity was determined using the method of Aebi (1984). Briefly, 4  $\mu$ L of erythrocyte lysate (diluted 1:10) were added to 2991  $\mu$ L of 67 mM sodium potassium phosphate (pH 7.4) and the samples were incubated at 37  $^{\circ}$ C for 10 min. Five microliters of 30% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) were added to the samples and the change in absorbance was immediately read at 240 nm for 130 s. Calculation of catalase activity was based on the molar extinction coefficient of  $H_2O_2$ . The intra- and inter-assay CV for catalase were 6.2% and 10.0%, respectively.

The determination of TAC was based on the method of Janaszewska and Bartosz (2002). Briefly, 20  $\mu$ L of plasma were added to 480  $\mu$ L of 10 mM sodium potassium phosphate (pH 7.4) and 500  $\mu$ L of 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^{\cdot}$ ) free radical and the samples were incubated in the dark for 30 min at room temperature. The samples were centrifuged for 3 min at 20,000g and the absorbance was read at 520 nm. The intra- and inter-assay CV for TAC were 2.9% and 5.4%, respectively. TAC is presented as mmol of DPPH $^{\cdot}$  reduced to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) by the antioxidants of plasma.

The hematological parameters were measured in a Sysmex K-1000 (TOA Electronics, Japan) autoanalyzer. Hematocrit and hemoglobin were determined on the day of blood collection.

#### 2.7. Statistical analysis

Oxidative stress, hematological and anthropometric data were analyzed by two-way (treatment  $\times$  time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on time. Pairwise comparisons were performed through simple main-effect analysis. Performance, rating of perceived exertion (RPE) and fat and carbohydrate oxida-

tion rates data were analyzed using dependent Student's *t* test. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . For all statistical analyses SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) was used. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### 3. Results

#### 3.1. Hematology

The values of the hematological parameters measured are presented in Table 1. In hematocrit, main effect of time and interaction of treatment  $\times$  time were found. In hemoglobin, red blood cells, white blood cells and platelets main effects of time were found. In mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH) and mean cell hemoglobin concentration (MCHC) neither significant main effects nor interactions were observed.

#### 3.2. Performance and RPE

Performance was defined as the time of cycling at the 95% of  $VO_{2max}$  (time Trial) until exhaustion. No significant difference in performance between the two groups was observed ( $P > 0.05$ ). The subjects of the experimental group reached exhaustion after  $169.4 \pm 47.6$  s and the subjects of the placebo group reached exhaustion after  $153.4 \pm 19.5$  s. Mean RPE for the 2 h exercise (experimental:  $12.4 \pm 0.48$ , placebo:  $12.3 \pm 0.69$ ) and for the 1 h exercise (experimental:  $14.3 \pm 0.40$ , placebo:  $13.9 \pm 0.50$ ) was not significantly different between the two conditions.

#### 3.3. Fat and carbohydrate oxidation

There were no significant differences in fat and carbohydrate oxidation during the 2 h submaximal exercise (Fig. 2A) and during the 1 h submaximal exercise following the cake ingestion (Fig. 2B).

#### 3.4. Oxidative stress markers

In plasma TBARS (Fig. 3A), main effect of treatment and interaction of treatment  $\times$  time ( $P < 0.05$ ) were found. In plasma protein carbonyls (Fig. 3B), in erythrocyte GSH (Fig. 3C), in erythrocyte catalase (Fig. 3D) and in plasma TAC (Fig. 3E) neither significant main effects nor interactions were observed.



**Table 1**  
Hematological variables in the subjects of experimental and placebo groups at the 8 time points of the experiment (mean  $\pm$  SEM).

	Experimental Groups							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hct <sup>a</sup> (%)	39.8 $\pm$ 0.9	40.9 $\pm$ 1.0*	39.5 $\pm$ 0.9	39.1 $\pm$ 1.1	41.8 $\pm$ 0.8*	39.1 $\pm$ 1.0	39.2 $\pm$ 0.8	37.5 $\pm$ 0.6**
Hb <sup>b</sup> (g dL <sup>-1</sup> )	14.1 $\pm$ 0.2	14.4 $\pm$ 0.2	14.0 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.2*	13.8 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.2
RBC <sup>c</sup> (10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> )	5.1 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.1*	5.1 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.9*	5.1 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.1
MCV <sup>d</sup> (fL)	77.6 $\pm$ 2.0	77.8 $\pm$ 2.0	77.8 $\pm$ 2.0	77.7 $\pm$ 2.0	77.7 $\pm$ 1.9	77.4 $\pm$ 2.1	77.9 $\pm$ 1.6	78.0 $\pm$ 1.7
MCH <sup>e</sup> (pg per cell)	27.4 $\pm$ 0.6	27.4 $\pm$ 0.6	27.4 $\pm$ 0.6	27.4 $\pm$ 0.5	27.3 $\pm$ 0.5	27.3 $\pm$ 0.7	27.4 $\pm$ 0.6	27.3 $\pm$ 0.5
MCHC <sup>f</sup> (g dL <sup>-1</sup> )	35.5 $\pm$ 0.6	35.4 $\pm$ 0.6	35.3 $\pm$ 0.5	35.3 $\pm$ 0.6	35.2 $\pm$ 0.5	35.4 $\pm$ 0.5	35.3 $\pm$ 0.4	35.6 $\pm$ 0.4
WBC <sup>g</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	6.3 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 0.9	11.0 $\pm$ 0.9*	10.0 $\pm$ 0.6*	14.0 $\pm$ 0.7*	9.2 $\pm$ 0.5*	6.7 $\pm$ 1.0	5.5 $\pm$ 0.4
Plt <sup>h</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	249.6 $\pm$ 18.4	294.9 $\pm$ 20.9*	260.1 $\pm$ 20.4	257.3 $\pm$ 19.2	325.9 $\pm$ 22.3*	266.7 $\pm$ 21.6	232.9 $\pm$ 14.9	229.1 $\pm$ 18.0
	Placebo Groups							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hct <sup>a</sup> (%)	39.2 $\pm$ 0.8	41.2 $\pm$ 0.7	39.6 $\pm$ 0.8	40.0 $\pm$ 0.7	41.8 $\pm$ 0.7*	39.8 $\pm$ 0.8	40.0 $\pm$ 0.5	40.0 $\pm$ 0.5**
Hb <sup>b</sup> (g dL <sup>-1</sup> )	13.9 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.3	13.9 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 1.1	14.6 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.2	13.9 $\pm$ 0.2	13.5 $\pm$ 0.2
RBC <sup>c</sup> (10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> )	5.0 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.1*	5.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.1
MCV <sup>d</sup> (fL)	77.8 $\pm$ 2.0	78.1 $\pm$ 1.2	77.9 $\pm$ 1.2	77.9 $\pm$ 1.1	78.2 $\pm$ 1.2	78.3 $\pm$ 1.2	78.0 $\pm$ 1.3	77.8 $\pm$ 1.4
MCH <sup>e</sup> (pg per cell)	27.6 $\pm$ 0.5	27.5 $\pm$ 0.5	27.4 $\pm$ 0.5	27.4 $\pm$ 0.4	27.3 $\pm$ 0.5	27.5 $\pm$ 0.5	27.1 $\pm$ 0.5	27.3 $\pm$ 0.5
MCHC <sup>f</sup> (g dL <sup>-1</sup> )	35.4 $\pm$ 0.5	35.2 $\pm$ 0.5	35.2 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 0.9	34.9 $\pm$ 0.4	35.2 $\pm$ 0.5	34.8 $\pm$ 0.5	35.1 $\pm$ 0.5
WBC <sup>g</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	6.2 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.6	10.3 $\pm$ 0.7*	9.9 $\pm$ 0.6*	12.9 $\pm$ 0.7*	8.6 $\pm$ 0.4*	6.0 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.2
Plt <sup>h</sup> (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	232.1 $\pm$ 12.2	279.1 $\pm$ 13.4	238.8 $\pm$ 13.7	251.9 $\pm$ 14.7	302.9 $\pm$ 15.1*	254.8 $\pm$ 11.4	233.9 $\pm$ 14.3	220.9 $\pm$ 15.2

<sup>a</sup> Hct = hematocrit.

<sup>b</sup> Hb = hemoglobin.

<sup>c</sup> RBC = red blood cells.

<sup>d</sup> MCV = mean cell volume.

<sup>e</sup> MCH = mean cell hemoglobin.

<sup>f</sup> MCHC = mean cell hemoglobin concentration.

<sup>g</sup> WBC = white blood cells.

<sup>h</sup> Plt = platelets.

\* Significantly different from the baseline value (T1) in the same group ( $P < 0.05$ ).

\*\* Significantly different from the respective value between the groups ( $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

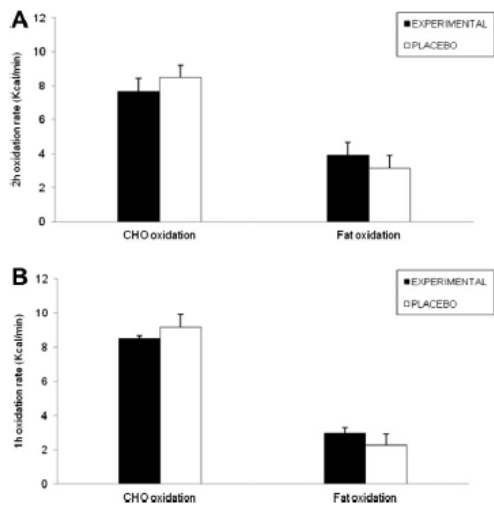
The present study examined the effect of a cake containing carbohydrates and whey protein in a specific ratio (3.5:1) on oxidative stress in a protocol of muscle damaging exercise (cycling) until exhaustion. The oxidative stress markers examined were TBARS, protein carbonyls, GSH, catalase and TAC. The main finding of the study is that the experimental cake reduced TBARS, namely lipid peroxidation, compared to the placebo cake containing carbohydrates only. However, it did not affect exercise performance as it was calculated by the time until exhaustion after cycling at an intensity corresponding to 95% of the volunteers established  $VO_{2max}$  (time Trial). Some reservations exist with respect to the validity of the TBARS assay in detecting lipid peroxidation, as this measure is criticized for the lack of specificity (Halliwell and Gutteridge, 2007). Although this may be considered as a limitation of the present work, yet many studies from our and other research groups (Fischer et al., 2011; Nikolaidis et al., 2007, 2008) have repeatedly shown that TBARS concentrations have been consistently increasing after exercise. In addition, it has been found that TBARS concentrations followed similar changes to F2-isoprostane concentrations (currently considered the reference method) after exercise (Margonis et al., 2007).

Previous studies have shown that supplementation of a carbohydrate or a carbohydrate-protein mixture does not diminish exercise-induced oxidative stress. More specifically, carbohydrate compared to placebo ingestion did not counter the increase in oxidative stress as determined via F2-isoprostanes and lipid hydroperoxides or modulate plasma antioxidant potential measured by ferric reducing ability of plasma in athletes running 3 h at 70% of  $VO_{2max}$  (McAnulty et al., 2003). Similar results were obtained as exhaustive resistance exercise and carbohydrate ingestion did not modulate oxidative stress (F2-isoprostanes concentration) or plasma antioxidant potential (ferric reducing capacity of plasma) in trained subjects (McAnulty et al., 2005). Karolkiewicz et al.

(2001) examined the effect of a carbohydrate and protein supplement on GSH and TBARS in 19 teenage track and field athletes divided into supplement and placebo groups. Carbohydrate and protein supplementation had no effect on plasma GSH or TBARS. Vasankari et al. (1998) examined 8 athletes who ran 27 km on two separate occasions with random assignment to carbohydrate or placebo conditions. This study found no effect of carbohydrate ingestion on serum diene conjugation compared to placebo after exercise. Finally, a drink containing carbohydrates, proteins and vitamins had no effect on plasma lipid hydroperoxides compared with an isocaloric drink of carbohydrates (Goldfarb et al., 2009).

There are several studies in the literature examining the effects of carbohydrate-protein supplements on exercise performance and the majority of them have observed ergogenic effects of carbohydrate-protein beverages. More specifically, it has been found that the addition of protein to a carbohydrate supplement enhanced aerobic endurance performance in cycling of different intensities (Ivy et al., 2003). In addition, a carbohydrate beverage with additional protein calories produced significant improvement in time to fatigue and reduction in muscle damage in athletes of endurance cycling (Saunders et al., 2004, 2007), and an improvement of exercise capacity was also demonstrated after treadmill running at 70% of  $VO_{2max}$  (Betts et al., 2007). Other investigators also observed that a mixture of carbohydrates plus a moderate amount of protein can improve aerobic endurance at exercise intensities between 45 and 70% of  $VO_{2max}$ , despite containing lower total carbohydrate and caloric content (Ferguson-Stegall et al., 2010). Niles et al. (2001) showed that a carbohydrate-protein drink improves time to exhaustion after recovery from endurance exercise. Recently, it has been suggested that the inclusion of small amounts of protein (typically 20% of total calories) in a carbohydrate beverage may produce benefits over traditional carbohydrate-only beverages (Ivy et al., 2002, 2003).

However, this is not always the case. Interestingly, it has also been shown that a carbohydrate-protein beverage had no effect



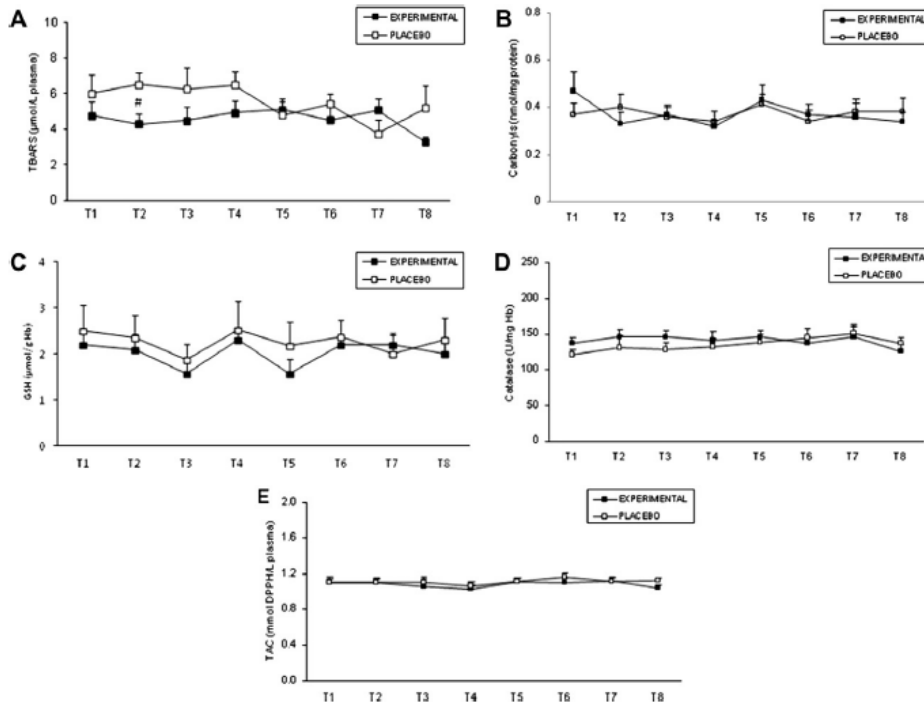
**Fig. 2.** The effects of experimental and placebo cake administration on fat and carbohydrate oxidation during the 2 h submaximal exercise (A) and during the 1 h submaximal exercise following the cake ingestion (B).

on exercise performance on isokinetic leg exercise (Haff et al., 2000) and on resistance exercise (Baty et al., 2007) compared to supplementation of beverages containing carbohydrates only.

In addition, Betts et al. (2005) revealed that including protein in a carbohydrate solution had no effect on treadmill run time to exhaustion at 85%  $\text{VO}_2\text{max}$ . These results are in line with the finding of the present study which has shown that the experimental cake containing a mixture of carbohydrates and whey protein did not enhance exercise performance.

Whey protein used in the present study is referred to as a bioactive compound. Its amino acid profile makes it ideal for improving body composition via supporting protein synthesis, body fat decrease and muscle growth. Other bioactive components found in whey might benefit additional aspects of health in active people and trained athletes by improving immune function and gastrointestinal health and exhibiting anti-inflammatory activity. In this line of reasoning, it has been demonstrated that men engaged in resistance training programs while supplemented with whey protein showed greater improvements in strength than men who trained without receiving whey protein as supplement (Burke et al., 2001). Additionally, supplementation of whey protein resulted in greater muscle performance and lower percentage of body fat compared to casein supplementation (Lands et al., 1999).

One question arising is why whey protein protects only lipids from oxidative stress? It is known that whey protein contains many times more cysteine than the placebo cake. This probably leads to preconditioning with high GSH levels, that the cell prefers



**Fig. 3.** The effects of experimental and placebo cake administration on plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (A), plasma protein carbonyls (B), erythrocyte glutathione (GSH) (C), erythrocyte catalase (D) and plasma total antioxidant capacity (TAC) (E). # Significantly different between experimental and placebo groups at the same time point ( $P < 0.05$ ).

as an antioxidant source (Elia et al., 2006). This is a probable explanation for the lower lipid peroxidation since the cell has a higher pool of GSH to consume and protect other macromolecules. Our explanation needs further investigation.

The main finding of this study is that a cake consisted of a specific ratio of carbohydrates and whey protein decreases lipid peroxidation in volunteers after cycling. This is the first study to administer in athletes a supplement in a cake form compared to others examining mainly the effects of liquid beverages. The research about this novel product needs to continue in order to be elucidated if the cake could probably be used as a supplement for the improvement of recovery and for the amelioration of the exercise detrimental effects on redox status of athletes.

## 5. Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

## Acknowledgments

This work was co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund, and by the MSC program “Biotechnology – Quality assessment in Nutrition and the Environment” in the Department of Biochemistry and Biotechnology at University of Thessaly.

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- American College of Sports Medicine. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 2000. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 57–90.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., 2001. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131, 856S–860S.
- Baty, J.J., Hwang, H., Ding, Z., Bernard, J.R., Wang, B., Kwon, B., Ivy, J.L., 2007. The effect of a carbohydrate and protein supplement on resistance exercise performance, hormonal response, and muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* 21 (2), 321–329.
- Betters, J.L., Criswell, D.S., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K.C., Deering, M., Yimlamai, T., Powers, S.K., 2004. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1179–1184.
- Betts, J.A., Stevenson, E., Williams, C., Sheppard, C., Grey, E., Griffin, J., 2005. Recovery of endurance running capacity: effect of carbohydrates–protein mixtures. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 15, 590–609.
- Betts, J., Williams, C., Duffy, K., Gunner, F., 2007. The influence of carbohydrate and protein ingestion during recovery from prolonged exercise on subsequent endurance performance. *J. Sports Sci.* 25 (13), 1449–1460.
- Burke, D.G., Chilibeck, P.D., Davidson, K.S., Candow, D.G., Farthing, J., Smith-Palmer, T., 2001. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11, 349–364.
- Elia, D., Stadler, K., Horvath, V., Jakus, J., 2006. Effect of soy- and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *Eur. J. Nutr.* 45, 259–266.
- Ferguson-Stegall, L., McCleave, E.L., Ding, Z., Kammer, L.M., Wang, B., Doermer, P.G., Liu, Y., Ivy, J.L., 2010. The effect of a low carbohydrate beverage with added protein on cycling endurance performance in trained athletes. *J. Strength Cond. Res.* 24 (10), 2577–2586.
- Fischer, G., Schwartz, D.D., Quindry, J., Barberio, M.D., Foster, E.B., Jones, K.W., Pascoe, D.D., 2011. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J. Appl. Physiol.* 110, 730–737.
- Goldfarb, A.H., Cho, C., Cho, H., Romano-Ely, B., Kent Todd, M., 2009. Protein and antioxidants in an isocaloric carbohydrate drink: effect on plasma oxidative-stress markers and IL-6. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 19 (2), 115–126.
- Gomez-Cabrera, M.C., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Ji, L.L., Vina, J., 2005. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* 567, 113–120.
- Ha, E., Zemel, M.B., 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. Nutr. Biochem.* 14, 251–258.
- Haff, G.G., Koch, A.J., Potteiger, J.A., Kuphal, K.E., Magee, L.M., Green, S.B., Jakicic, J.J., 2000. Carbohydrate supplementation attenuates muscle glycogen loss during acute bouts of resistance exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 10 (3), 326–339.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, fourth ed. Oxford University Press, New York.
- Ivy, J.L., Goforth Jr., H.W., Damon, B.M., McCauley, T.R., Parsons, E.C., Price, T.B., 2002. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate–protein supplement. *J. Appl. Physiol.* 93 (4), 1337–1344.
- Ivy, J.L., Res, P.T., Sprague, R.C., Widzer, M.O., 2003. Effect of a carbohydrate–protein supplement on endurance performance during exercise of varying intensity. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 13, 382–395.
- Janaszewska, A., Bartosz, G., 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 231–236.
- Jeukendrup, A.E., Wallis, G.A., 2005. Measurement of substrate oxidation during exercise by means of gas exchange measurements. *Int. J. Sports Med.* 26 (Suppl 1), S28–37.
- Ji, L.L., 2007. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp. Gerontol.* 42, 582–593.
- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., 2006. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 425–435.
- Karolkiewicz, J., Szczesniak, L., Kasprzak, Z., Rychlewski, T., 2001. The influence of endurance training and carbohydrate and protein supplementation on concentrations of reduced glutathione (GSH) in red blood cells and TBARS in blood plasma of athletes. *Med. Sports* 17, 119–125.
- Keles, M.S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., Akcay, F., 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 28, 141–143.
- Lands, L.C., Grey, V.L., Smountas, A.A., 1999. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J. Appl. Physiol.* 87, 1381–1385.
- Madureira, A.R., Claudia, C.L., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, X.F., 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40, 1197–1211.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzizakou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiropoulos, I., Takidaris, K., Kourtas, D., 2007. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free radical Biol. Med.* 43 (6), 901–910.
- Marshall, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9 (2), 136–156.
- McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Utter, A.C., Henson, D.A., Dumke, C.L., Vinci, D.M., 2003. Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stress and plasma antioxidant potential following a 3 h run. *Free Radical Res.* 37 (8), 835–840.
- McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Utter, A.C., Dumke, C.L., 2005. Effect of resistance exercise and carbohydrate ingestion on oxidative stress. *Free Radical Res.* 39 (11), 1219–1224.
- Morr, C.V., Ha, E.Y.W., 1993. Whey proteins concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci.* 33 (6), 431–476.
- Nagendra, P.S., 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1), S3–S10.
- Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A.Z., Kourtas, D., 2007. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 197–205.
- Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Kourtas, D., 2008. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 38 (7), 579–606.
- Niles, E.S., Lachowetz, T., Garfi, J., Sullivan, W., Smith, J.C., Leyh, B.P., Headley, S.A., 2001. Carbohydrate–protein drink improves time to exhaustion after recovery from endurance exercise. *J. Exerc. Phys.* 4, 45–52.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene-tetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357, 83–86.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., 2004. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Saunders, M., Kane, M., Todd, K., 2004. Effects of a carbohydrate–protein beverage on cycling endurance and muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36, 1233–1238.
- Saunders, M.J., Luden, N.D., Hemick, J.E., 2007. Consumption of an oral carbohydrate–protein gel improves cycling endurance and prevents postexercise muscle damage. *J. Strength Cond. Res.* 21, 678–684.
- Schneider, B.S., Tiidus, P.M., 2007. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med.* 37, 837–856.
- Urso, M.L., Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189, 41–54.
- Vasankari, T., Kujala, U., Ahotupa, S.M., 1998. Effects of ascorbic acid and carbohydrate ingestion on exercise induced oxidative stress. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 38, 281–285.
- Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., Kourtas, D., 2008. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33, 1140–1154.
- 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.
- Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J., Wong, A.W., 2009. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol. Sci.* 108 (1), 4–18.





## Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate–whey protein cake after exhaustive cycling in humans

Efthalia Kerasioti<sup>a</sup>, Dimitrios Stagos<sup>a</sup>, Athanasios Jamurtas<sup>b</sup>, Alexandra Kiskini<sup>a</sup>, Yiannis Koutedakis<sup>b,c,d</sup>, Nikos Goutzourelas<sup>a</sup>, Spyros Pournaras<sup>e</sup>, Aristidis M. Tsatsakis<sup>f</sup>, Dimitrios Kouretas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larisa 41221, Greece

<sup>b</sup> Department of Exercise and Sport Sciences, University of Thessaly, Trikala 42100, Greece

<sup>c</sup> School of Sport, Performing Arts and Leisure, University of Wolverhampton, WSI 3BD, UK

<sup>d</sup> Institute of Human Performance and Rehabilitation, Trikala 42100, Greece

<sup>e</sup> Department of Medicine, University of Thessaly, Larisa 41110, Greece

<sup>f</sup> Department of Forensic and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71409, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 27 January 2013

#### Keywords:

Exercise  
Inflammation  
Whey protein  
Interleukin-6  
Interleukin-10  
CRP

### ABSTRACT

Intense exercise induces increased levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Thus, the purpose of this study was to examine the effects of a special cake (consisting of carbohydrate to whey protein 3.5:1) vs. an isocaloric carbohydrate cake on inflammatory markers after exhaustive cycling in humans. Nine subjects received either the experimental or placebo cake in a counterbalanced fashion using a crossover, double-blind, repeated-measures design. They performed one trial involving a 2 h exercise on a cycle ergometer at 60–65%  $\dot{V}O_{2\max}$  followed by a 4 h recovery and then a second trial involving an 1 h exercise at 60–65%  $\dot{V}O_{2\max}$  which was increased at 95%  $\dot{V}O_{2\max}$ . Blood samples were collected pre-exercise, 30 min and 4 h post-exercise, post-time Trial and 48 h post-time Trial. Cakes were consumed immediately post-exercise and every 1 h for the next 3 h. The results showed that consumption of the experimental cake reduced significantly ( $p < 0.05$ ), 4 h post-exercise, the pro-inflammatory protein levels IL-6 and CRP compared to the control group by 50% and 46% respectively. Moreover, in the experimental cake group, the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was higher by 118%, 4 h post-exercise, compared to the control group but not statistically significant.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Exercise has been introduced as a model of physical stress (the force applied to a given area of biological tissue) (Pedersen, 2000). Intense exercise influences cytokine responses through circulatory system changes and endocrine hormones secreted in response to physical stress. Thus, a number of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines are increased after intense exercise. For

example, plasma interleukin (IL)-1a, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-10, IL-8 and IL-6 levels increase in response to exercise (Febbraio and Pedersen, 2002, 2005; Gleeson and Bishop, 2005; Pedersen et al., 2004; Petersen and Pedersen, 2005). Toward the end of the inflammatory cascade, C-reactive protein (CRP), an acute-phase protein, is induced by inflammatory cytokines, particularly IL-6. The magnitude of the inflammatory response depends on the intensity, duration and chronicity of the exercise. If pathological inflammation occurs, then excessive, irreparable damage to host tissues can occur (Calder et al., 2009). To avoid these detrimental effects, investigators have tried to suppress inflammation via supplementation of carbohydrate or carbohydrate and protein beverages (Afrondeh et al., 2010; Miles et al., 2007; Robson-Ansley et al., 2011; Rowlands et al., 2008; Starkie et al., 2000, 2001). Carbohydrate supplementation during prolonged endurance exercise has been associated with higher blood glucose and lower cortisol, epinephrine and growth hormone responses (Murray et al., 1991). During intense exercise due to the low levels of blood glucose, the HPA axis is activated leading to increased levels of cortisol and epinephrine, which have anti-inflammatory action. The

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; BCAAs, branched-chain amino acids; CRP, C-reactive protein; CV, coefficients of variation; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; IL, interleukin; MDD, minimum detectable dose; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ .

\* Corresponding author. Address: Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26, Aioulou St., Larisa 41221, Greece. Tel.: +30 2410 565277; fax: +30 2410 565290.

**E-mail addresses:** e-f-thalia@hotmail.com (E. Kerasioti), stagkos@med.uth.gr (D. Stagos), ajamurt@pe.uth.gr (A. Jamurtas), alexkisk@gmail.com (A. Kiskini), y.koutedakis@pe.uth.gr (Y. Koutedakis), nikgkoutz@gmail.com (N. Goutzourelas), pournaras@med.uth.gr (S. Pournaras), aris@med.uoc.gr (A.M. Tsatsakis), dkouret@uth.gr (D. Kouretas).

organism in order to balance this anti-inflammatory activity produces pro-inflammatory cytokines. Given the potential link between stress hormones and cytokine production it is hypothesized that carbohydrate vs. placebo supplementation would keep plasma glucose levels at a higher level, attenuating the rise in epinephrine and cortisol and both pro- and anti-inflammatory cytokines.

In recent years, milk constituents as proteins have been recognized as functional foods suggesting that their use has a direct and measurable effect on health outcomes (Aimutis, 2004; Nagendra, 2000). The main sources of milk proteins are the casein and the whey. Specifically, whey is a by-product of cheese manufacturing that remains in an aqueous liquid after milk has been curdled and strained. The components of whey including beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins, lactoperoxidase enzymes, glycomacropetides and lactose demonstrate a range of immune-enhancing properties (Madureira et al., 2007; Walzem et al., 2002). Therefore, whey is considered a functional food, as it is involved in preventing or improving several pathological conditions (Marshall, 2004; Smithers, 2008). Thus, whey is currently a popular dietary protein supplement purported to provide antimicrobial activity, immune modulation, improved muscle strength and body composition, and to prevent cardiovascular disease and osteoporosis (Marshall, 2004). Relative to other protein sources, whey has a high concentration of branched-chain amino acids (BCAAs) – leucine, isoleucine and valine. BCAAs, particularly leucine, are important factors in tissue growth and repair. Moreover, leucine has been identified as a key amino acid in protein metabolism during the translation-initiation pathway of protein synthesis (Anthony et al., 2001; Balage and Darveit, 2010) Whey is also rich in sulphur-containing cysteine and methionine amino acids that enhance immune system function due to their intracellular conversion to glutathione (Marshall, 2004).

The aim of the present study was to examine the effects of a special cake consisted of a specific ratio of carbohydrates and whey protein on inflammatory markers in athletes after exhaustive exercise. Supplementation of carbohydrates and proteins in a cake form is innovative, since previous studies used mostly liquid supplements.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Nine physically active men (age,  $28 \pm 2$  years; height,  $184 \pm 3$  cm; weight,  $77 \pm 2$  kg; body fat,  $11 \pm 2\%$ ; body mass index,  $23 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup>,  $\text{VO}_2\text{max}$ ,  $4.1 \pm 0.2$  L/min mean  $\pm$  SEM) participated in the present study. The subjects were training at least three times per week for at least 3 h and had a training history of at least 2 years. They were nonsmokers and were not receiving anti-inflammatory medication or nutritional supplements.  $\text{VO}_2\text{max}$  measurement ensured that the subjects exercised at similar intensities. A written informed consent to participate in the study was provided by all participants after they had been informed of all risks, discomforts and benefits involved in the study. The procedures were in accordance with the Helsinki declaration of 1975 and approval was received by the human subjects committee of the University of Thessaly.

The subjects visited the laboratory for the first time for a screening of anthropometric parameters and they completed a health and activity questionnaire. Each participant reported to the laboratory in the morning after an overnight fast and abstained from alcohol and caffeine for 24 h. Body mass was measured to the nearest 0.5 kg (Beam Balance 710, Seca, UK) with the subjects lightly dressed and barefoot. Standing height was measured to the nearest 0.5 cm (Stadiometer 208, Seca). Percentage body fat was calculated from seven skinfold measures (average of two measurements of each site), using a Harpenden caliper (John Bull, UK), according to published guidelines (American College of Sports Medicine, 2000). Body mass index was calculated as the ratio of body weight (kg)/height (m<sup>2</sup>).  $\text{VO}_2\text{max}$  was determined after a maximal consumption test on a cycle ergometer (Monark 834E, Sweden) was performed. The protocol began at 1.5 kg ( $-70$  RPM) for 1 min and was increased by 0.5 kg every 2 min until  $\text{VO}_2\text{max}$  was reached. Respiratory gas variables were measured using a metabolic cart (Vmax29; Sensomedics, USA), which

was calibrated before each test using standard gases of known concentration. Exercise heart rate was monitored by telemetry (Polar Tester, S610TM, Electro Oy, Finland).

### 2.2. Diet and activity before the experiment

The subjects were instructed to follow their usual eating habits during the days before the experiment. They were also asked to record on a dietary record sheet their diet 3 days before the first exercise bout and for 2 days after it. All volunteers were instructed to stay away from strenuous physical activity for 2 days preceding and 2 days following the experiment. The subjects received a copy of their dietary record sheets and were asked to follow exactly the same food intake patterns (as recorded in their dietary record sheets) before their second experimental session.

### 2.3. Design

Each subject participated in two trials in a counterbalanced fashion (same subjects received both the experimental cake and placebo cake in a random order) using a crossover, double-blind, repeated-measures design. The subjects visited the laboratory for a second time 5 days after their  $\text{VO}_2\text{max}$  determination (08:00–09:00 h in the morning) and were participated either in the experimental or placebo trial. Each subject participated in two experimental sessions separated with wash out period of 1 week. During each session the subjects consumed either an experimental cake providing 0.9 g carbohydrate/kg body weight/h and 0.26 g protein/kg body weight/h, providing a ratio between carbohydrates and protein of 3.5:1, or a placebo cake providing 1.1 g carbohydrate/kg body weight/h and 0.1 g protein/kg body weight/h. The experimental protocol consisted of the following phases: (I) 2 h of continuous cycling on cycle ergometer (Monark 834E, Sweden) at an intensity corresponding to 60–65% of their established  $\text{VO}_2\text{max}$ , (II) 4 h of recovery, (III) 1 h of continuous cycling at 60–65% of their  $\text{VO}_2\text{max}$ , (IV) cycling speed was increased to 95% of their  $\text{VO}_2\text{max}$  until exhaustion (time Trial), (V) 1 h of recovery (Fig. 1). Exercise was performed at a temperature of  $21 \pm 2$  °C and  $45 \pm 4\%$  relative humidity. To attenuate subjects' discomfort, water was available *ad libitum* throughout the experiment and its consumption was recorded. Expired gas samples were collected every 15 min to ensure the prescribed exercise intensity. Perceived fatigue of the subjects was recorded every 15 min using Borg scale during phases I and III and at the end of phase IV. Blood samples were collected pre-exercise (T1), 30 min post-exercise (T2), 4 h post-exercise (T3), immediately post-time Trial (T4) and 48 h post-time Trial (T5) (Fig. 1). During phase I (2 h cycling at 60–65%  $\text{VO}_2\text{max}$ ), muscle glycogen stores are depleted and the organism is stressed and as a response produces cytokines. During phase II (4 h recovery), the cake was administered in order to find out how it affects inflammatory markers after intense exercise. It was followed 1 h cycling at 60–65%  $\text{VO}_2\text{max}$  in order to see the magnitude of the increase in the inflammatory markers after the first bout of exercise and the cake administration. The intensity of exercise was increased at 95%  $\text{VO}_2\text{max}$  until exhaustion in order to determine if the cake administration affects performance. One experimental or placebo cake was consumed by the subjects immediately post-exercise and three more experimental or placebo cakes were consumed every 1 h after the first one. Exercise testing, cake administration and blood sampling was repeated at the same time of day and in the same order before and after the first trial (experimental, Fig. 1A) as well as before and after the second trial (placebo, Fig. 1B).

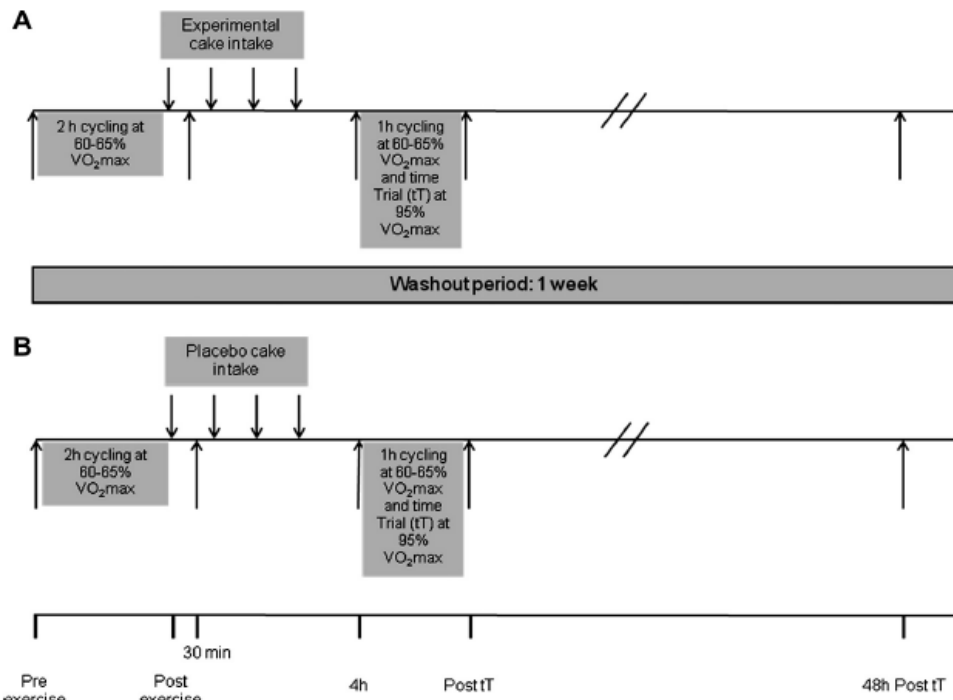
### 2.4. Blood collection and handling

Blood samples (10 mL) were drawn from a forearm vein with subjects in a seated position. Blood was collected in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes, centrifuged immediately at 1370 g for 10 min at 4 °C and the plasma was collected and used for the determination of IL-6, IL-10 and CRP. Plasma lysate was then stored at  $-80$  °C until analyses.

### 2.5. Plasma IL-6 and IL-10 measurement

For IL-6 and IL-10 determination, a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (R & D systems, Minneapolis, MN, USA) was used. Briefly, a monoclonal antibody specific for IL-6 or IL-10 has been pre-coated onto a microplate. Afterwards, 100  $\mu$ l and 200  $\mu$ l of standards and samples were added into the wells for IL-6 and IL-10 assay respectively, and any IL-6 or IL-10 present in the samples was bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for IL-6 or IL-10 was added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution was added to the wells. After an incubation period, an amplifier solution was added to the wells and color develops in proportion to the amount of IL-6 or IL-10 bound in the initial step. The color development was stopped and the intensity of the color was measured at 490 nm and also at 650 nm as a reference wavelength in a Bio-Tek ELx800 ELISA microplate reader (Winooski, VT, USA). The minimum detectable dose (MDD) of IL-6 and IL-10 was 0.039 pg/mL and 0.09 pg/mL, respectively. The intra-assay coefficients of variation (CV) for IL-6 and IL-10 were 7.4% and 6.6%, respectively.





**Fig. 1.** Experimental design. Downward arrows indicate time of experimental (A) or placebo and (B) cake intake. Upward arrows indicate time of blood sampling.

#### 2.6. Plasma CRP measurement

The immunoturbidimetric assay for CRP was carried out using Olympus System CRP reagent, with an Olympus AU2700 apparatus (Rungis, France). The lower detection limit for CRP was 1.57 mg/L. The assay was linear within a 5–300 mg/L concentration range.

#### 2.7. Statistical analysis

Inflammation data were analyzed by two-way (treatment  $\times$  time) analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on time. Pairwise comparisons were performed through simple main-effect analysis. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . For all statistical analyses SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) was used. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

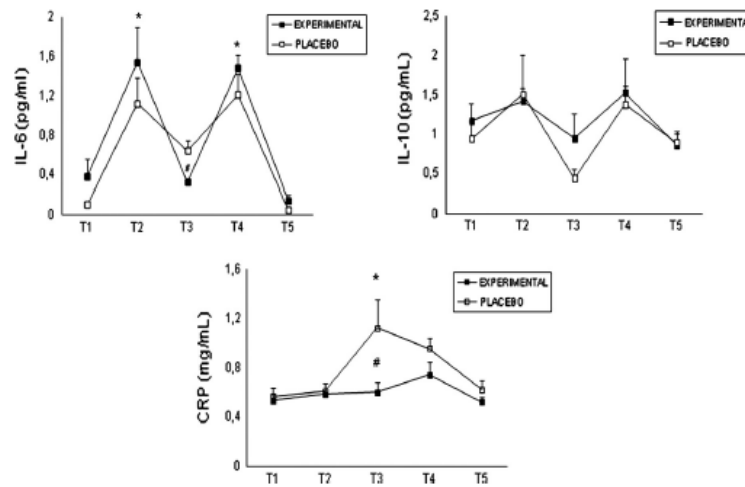
### 3. Results

In plasma concentration of IL-6 (Fig. 2A), main effect of time and treatment ( $p < 0.05$ ) was found. In particular, there was a statistical significant increase in plasma IL-6 concentration at both 30 min post-exercise (T2) and post-tT (T4) compared to pre-exercise (T1) (Fig. 2A). Moreover, administration of the experimental cake caused a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in plasma concentrations of IL-6, at 4 h post-exercise (T3), by 50% compared to the placebo group (Fig. 2A). On the contrary, in plasma IL-10 concentration (Fig. 2B), there was not observed significant main effect of time or treatment. However, plasma IL-10 levels, at 4 h post-exercise (T3), were higher by 118%, in the experimental group compared to the placebo group, but this difference was not statistically significant (Fig. 2B). In plasma CRP concentration (Fig. 2C), main effect of time and treatment ( $p < 0.05$ ) was found. In particular, there was a significant ( $p < 0.05$ ) increase in plasma CRP concentration at 4 h post-exercise (T3) compared to pre-exercise (T1). Moreover, similar to IL-6, plasma concentrations of CRP in the subjects receiving

the experimental cake were statistically significant ( $p < 0.05$ ) lower by 46%, at 4 h post-exercise (T3), than the subjects receiving the placebo (Fig. 2C).

### 4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the effects of a cake containing carbohydrates and whey protein in a specific ratio (3.5:1) on inflammatory markers after exhaustive cycling in humans. Specifically, the inflammatory markers IL-6, IL-10 and CRP were measured in plasma samples of the subjects participated in the experiment. IL-6 is produced in larger amounts (up to 100-fold) than any other cytokine in response to exercise (Fischer, 2006). During physical exercise IL-6 is predominantly produced within the working skeletal muscles (Jonsdottir et al., 2000; Starkie et al., 2001; Wood et al., 2009) and this production, in turn, accounts for the exercise-induced IL-6 increase in plasma (Pedersen and Edvard, 2009; Steensberg et al., 2000). The magnitude of the exercise-induced IL-6 response is dependent on intensity and especially duration of the exercise, while the mode of exercise has little effect. IL-6 has been classified as both an anti-inflammatory and a pro-inflammatory cytokine (Gleeson et al., 2011). It exerts its anti-inflammatory properties only during exercise, but at the end of exercise it exhibits pro-inflammatory activity through involvement in the generation of the acute phase response, the local and systemic events accompanying inflammatory local response (Mastorakos et al., 2005). IL-6 increases basal and insulin-stimulated glucose uptake which is facilitated by translocation of GLUT4 to the plasma membrane (Carey et al., 2006). Exercise training may reduce basal IL-6 production as well as the magnitude of IL-6 response in the acute exercise by counteracting several potential



**Fig. 2.** The effects of experimental and placebo cake administration on (A) plasma interleukin (IL)-6, (B) plasma interleukin (IL)-10 and (C) plasma C-reactive protein (CRP). T1 = pre-exercise, T2 = 30 min post-exercise, T3 = 4 h post-exercise, T4 = immediately post-time Trial, T5 = 48 h post-time Trial. \*Significantly different between experimental and placebo groups at the same time point ( $p < 0.05$ ). #Significantly different compared to pre-exercise ( $p < 0.05$ ).

stimuli of IL-6. Accordingly, a decreased plasma IL-6 concentration in response to exercise characterizes normal training adaptation (Fischer, 2006). IL-10 downregulates or completely inhibits the expression of several pro-inflammatory cytokines and other soluble mediators, thereby further compromising the capacity of effector T cells to sustain inflammatory responses (Maynard and Weaver, 2008; Moore et al., 2001). Thus, IL-10 is a potent promoter of an anti-inflammatory state. CRP is an acute phase protein which reflects a measure of the acute phase response. IL-6 and other cytokines trigger the CRP synthesis in liver.

The key finding of the present study is that the consumption of the experimental cake attenuated post-cycling inflammatory response. Our findings are in accordance with the majority of previous studies, which have shown that carbohydrate ingestion attenuated increase in pro-inflammatory cytokines, especially IL-6. For example it has been reported that consumption of about 1 g of carbohydrate per kilogram of body mass per hour attenuates the IL-6 response to prolonged endurance exercise (Nieman et al., 2003, 2005). Scharhag et al. (2006) showed that carbohydrate supplementation reduced significantly total plasma IL-6 after cycling for 4 h in humans. Moreover, in another study, carbohydrate supplementation attenuated the increase in plasma IL-6 during both running and cycling compared to placebo beverage ingestion (Nieman et al., 2003). Furthermore, Robson-Ansley et al. (2011), who examined the effect of carbohydrate ingestion on IL-6 during a 90 min self-paced time trial in seven trained male runners, reported that carbohydrate ingestion attenuated IL-6 response to exercise. Also, the results from a study involved 7 moderately trained males performing both running and cycling, demonstrated that carbohydrate ingestion decreases the increase in IL-6 (Starkie et al., 2001).

Concerning the anti-inflammatory IL-10, its levels were elevated by 118% at 4 h post-exercise compared to the placebo group, although not statistically significant. However, in a previous study, after 2 h of intensive resistance training, there were not differences in the plasma IL-10 level between carbohydrate and placebo ingestion (Nieman et al., 2003).

CRP is an inflammatory protein made by the liver in response to increases in IL-6 and other inflammatory mediators (Edward,

2005). Rises in CRP indicate that the IL-6 produced at the tissue level is triggering an acute-phase, systemic inflammatory response. Thus, the reduced levels of CRP in the experimental group, at 4 h post-exercise, compared to the placebo group are attributed to the reduced levels of IL-6 at the same time point. However, Henson et al. (2000) demonstrated that after 2 h of rowing there were no differences in CRP levels between the carbohydrate and the placebo group. Similarly, in another study, after eccentric elbow flexion there was also no significant difference in CRP between carbohydrate and placebo group (Afroundeh et al., 2010).

The above differences in the results between the present and the previous studies may be due to the different type of exercise and to the protein that our supplement contains.

In the literature there are a limited number of studies concerning the effects of a carbohydrate-protein supplement on inflammatory markers. Cosio-Lima et al. (2012) demonstrated that feedings of a carbohydrate-protein drink during long periods of cycling did not greatly attenuate inflammatory responses in cyclists when compared to feedings of a carbohydrate-alone solution. Moreover, in another study, the effects of a carbohydrate-protein ingestion on inflammatory markers in 12 cyclists were inconclusive or trivial (Rowlands et al., 2008). These results are in contrast with ours, which showed that the consumption of a carbohydrate-protein supplement in a cake form resulted in attenuated levels of inflammatory markers after exhaustive cycling. Since, in the above studies, the protein source used was also whey protein and a similar type of exercised was used, the differences in the results may be due to the specific peptide composition of our whey protein and/or to the fact that our supplement was in a cake form, while the other studies used liquid beverages. Interestingly, a mouse study demonstrated that lactoferrin, a component of whey protein, had anti-inflammatory properties by reducing the levels of TNF- $\alpha$  and increasing IL-10, thus decreasing inflammation (Kobayashi et al., 2011).

Moreover, since increased formation of reactive oxygen species (ROSS) occurring during exercise is capable of activating transcription factors known to regulate IL-6 synthesis (Fischer, 2006), the anti-inflammatory activity of the experimental cake may also be attributed to its antioxidant effects (Kerasioti et al., 2012). In

particular, in a previous study using the same type of exercise, we have shown that the administration of the experimental cake reduced thiobarbituric acid reactive substances (TBARSs) plasma levels at 30 min post-exercise (T2) (Kerasioti et al., 2012). Thus, by exerting its antioxidant effects the carbohydrate–protein supplement may attenuate the post-exercise inflammatory response.

Moreover, elevated oxidative stress and inflammation is related to a higher probability of developing the overtraining syndrome (Margonis et al., 2007; Tanskanen et al., 2010). Previous research (Kerasioti et al., 2012) has shown that this nutritional intervention results in reduced oxidative stress and the results from this study indicate lower inflammation following ingestion of this cake. Therefore, long term ingestion of this food could result in lower oxidative stress and inflammation and therefore preventing unwanted situations such as overtraining.

In conclusion, the main finding of this study is that a cake consisted of a specific ratio of carbohydrates and whey protein exhibits anti-inflammatory activity, since it decreased the pro-inflammatory markers as IL-6 and CRP, while it had a tendency to increase anti-inflammatory marker IL-10 after exhaustive cycling in humans.

### Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgments

This work was co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

### References

- Afroundeh, R., Siahkhouhian, M., Khalili, A., 2010. The effect of post-exercise carbohydrate ingestion on inflammatory responses to short time, high-force eccentric exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 50 (2), 182–188.
- Aimutis, W.R., 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *J. Nutr.* 134, 989S–995S.
- American College of Sports Medicine., 2000. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 57–90.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., 2001. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131, 856S–860S.
- Balage, M., Darvevet, D., 2010. Long-term effects of leucine supplementation on body composition. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* 13 (3), 256–270.
- Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G.A., Folkerts, G., Friedmann, P.S., Frost, G.S., Guarnier, F., Lovik, M., Macfarlane, S., Meyer, P.D., MRabet, L., Serafini, M., van Eden, W., van Loo, J., Vas Dias, W., Vidry, S., Winkhofer-Roob, B.M., Zhao, J., 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br. J. Nutr.* 101 (Suppl. 1), S1–S45.
- Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., Kemp, B.E., Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55 (10), 2688–2697.
- Cosio-Lima, L.M., Desai, B., Stelzer, J.W., Schuler, P.B., 2012. Effects of a 4:1 carbohydrate/protein solution versus a carbohydrate-alone solution on IL-6, TNF- $\alpha$  and cortisol during prolonged cycling in hot environmental conditions. *Open Access J. Sports Med.* 3, 21–26.
- Edward, T.H., 2005. A new perspective on the biology of C-reactive protein. *Circ. Res.* 97, 609–611.
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2002. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 16, 1335–1347.
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2005. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 33, 114–119.
- Fischer, C.P., 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 6–33.
- Gleeson, M., Bishop, N.C., 2005. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann. Transplant.* 10, 43–48.
- Gleeson, M., Bishop, N., Stensel, D.J., Lindley, M.R., Mastana, S.S., Nimmo, M.A., 2011. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11 (9), 607–615.
- Henson, D.A., Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Shannon, M., Bolton, M.R., Davis, J.M., Gaffney, C.T., Kelln, W.J., Austin, M.D., Hjertman, J.M., Schilling, B.K., 2000. Influence of carbohydrate on cytokine and phagocytic response to 2 h of rowing. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32 (8), 1384–1389.
- Jonsdottir, I.H., Schjerling, P., Ostrowski, K., Asp, S., Richter, E.A., Pedersen, B.K., 2000. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J. Physiol.* 528 (Pt 1), 157–163.
- Kerasioti, E., Kiskini, A., Veskoukis, A., Jamurtas, A., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A.M., Koutedakis, Y., Stagos, D., Kouretas, D., Karathanos, V., 2012. Effect of a special carbohydrate–protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem. Toxicol.* 50 (8), 2805–2810.
- Kobayashi, S., Abe, Y., Inanami, O., Oda, S., Yamauchi, K., Hankanga, C., Yasuda, J., Sato, R., 2011. Oral administration of bovine lactoferrin upregulates neutrophil functions in a dog with familial  $\beta$ 2-integrin-related neutrophil dysfunction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143 (1–2), 155–161.
- Madureira, A.R., Claudia, C.L., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, X.F., 2007. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40, 1197–1211.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiropoulos, I., Taxildaris, K., Kouretas, D., 2007. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Rad. Biol. Med.* 43, 901–910.
- Marshall, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9 (2), 136–156.
- Mastorakos, G., Pavlatou, M., Diamanti-Kandarakis, E., Chrousos, G.P., 2005. Exercise and the stress system. *Hormones* 4 (2), 73–89.
- Maynard, C.L., Weaver, C.T., 2008. Diversity in the contribution of IL-10 to cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* 226, 219–233.
- Miles, M.P., Pearson, S.D., Andring, J.M., Kidd, J.R., Volpe, S.L., 2007. Effect of carbohydrate intake during recovery from eccentric exercise on interleukin-6 and muscle-damage markers. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 17 (6), 507–520.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Murray, R., Paul, G.L., Seifent, J.G., Eddy, D.E., 1991. Responses to varying rates of carbohydrate ingestion during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23, 713–718.
- Nagendra, P.S., 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1), S3–S10.
- Nieman, D.C., Davis, J.M., Henson, D.A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Carson, J.A., Brown, A., Lee, W.J., McNulty, S.R., McNulty, L.S., 2003. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3 h run. *J. Appl. Physiol.* 94, 1917–1925.
- Nieman, D.C., Davis, J.M., Henson, D.A., Gross, S.J., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Carson, J.A., Brown, A., McNulty, S.R., McNulty, L.S., Triplett, N.T., 2005. Muscle cytokine mRNA changes after 2.5 h of cycling: influence of carbohydrate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 1283–1290.
- Pedersen, B.K., 2000. Exercise and cytokines. *Immun. Cell Biol.* 78, 532–535.
- Pedersen, B.K., Edward, F., 2009. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J. Appl. Physiol.* 107, 1006–1014.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Wolsk-Petersen, E., Febbraio, M., 2004. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc. Nutr. Soc.* 63, 263–267.
- Petersen, A.M., Pedersen, B.K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 98, 1154–1162.
- Robson-Ansley, P., Walshe, L., Ward, D., 2011. The effect of carbohydrate ingestion on plasma interleukin-6, hepcidin and iron concentrations following prolonged exercise. *Cytokine* 50 (2), 182–188.
- Rowlands, D.S., Rossler, K., Thorp, R.M., Graham, D.F., Timmons, B.W., Stannard, S.R., Tarnopolsky, M.A., 2008. Effect of dietary protein content during recovery from high-intensity cycling on subsequent performance and markers of stress, inflammation, and muscle damage in well-trained men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33 (1), 39–51.
- Scharhag, J., Meyer, T., Auracher, M., Gabriel, H.H., Kindermann, W., 2006. Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38 (2), 286–292.
- Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins – from ‘gutter-to-gold’. *Int. Dairy J.* 18 (7), 695–704.
- Starkie, R.L., Angus, D.J., Rolland, J., Hargreaves, M., Febbraio, M.A., 2000. Effect of prolonged submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J. Physiol.* 528, 647–655.
- Starkie, R.L., Arfsten, M.J., Koukoulas, I., Hawley, J.A., Febbraio, M.A., 2001. Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *J. Physiol.* 533, 585–591.
- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., Klarlund, P.B., 2000. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol.* 529 (Pt 1), 237–242.
- Tanskanen, M., Atalay, M., Uusitalo, A., 2010. Altered oxidative stress in overtrained athletes. *J. Sports Sci.* 28 (3), 309–317.
- 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.
- Wood, L.J., Nail, L.M., Winters, K.A., 2009. Does muscle-derived interleukin-6 mediate some of the beneficial effects of exercise on cancer treatment-related fatigue? *Oncol. Nurs. Forum.* 36 (5), 519–524.





Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells



Efthalia Kerasioti<sup>a</sup>, Dimitrios Stagos<sup>a</sup>, Alexandros Priftis<sup>a</sup>, Stefanos Aivazidis<sup>a</sup>, Aristidis M. Tsatsakis<sup>b</sup>,  
A. Wallace Hayes<sup>c,d</sup>, Demetrios Kouretas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aioulou St., Larissa 41221, Greece

<sup>b</sup> Department of Forensic and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71409, Greece

<sup>c</sup> Harvard School of Public Health, 677 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, USA

<sup>d</sup> Spherix Consulting, Inc., 6430 Rockledge Drive #503, Bethesda, MD 20817, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 October 2013

Received in revised form 20 December 2013

Accepted 21 January 2014

Available online 30 January 2014

## Keywords:

Whey protein  
C2C12 muscle cells  
Reducing power  
Hydroxyl radical  
GSH  
ROS  
TBARS

## ABSTRACT

In the present study, the *in vitro* scavenging activity of sheep whey protein against free radicals, as well as its reducing power were determined and compared with that of beef protein, soy protein and cow whey protein. Moreover, the possible protective effects of sheep whey protein from tert-butyl hydroperoxide (tBHP)-induced oxidative stress in muscle C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells were determined by assessing oxidative stress markers by flow cytometry and spectrophotometry. The results showed that sheep whey protein scavenged DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> and OH<sup>•</sup> radicals with IC<sub>50</sub> values of 3.1, 4.1 and 1.8 mg of protein/ml. Moreover, the reducing power activity assessed with potassium ferricyanide of sheep whey protein was 1.3 mg/ml. As regards to the antioxidant effects in muscle cell line, sheep whey protein at 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg of protein/ml increased GSH levels up to 138%, lowered TBARS levels up to 25% and decreased ROS levels up to 41.4%.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are products of normal metabolism (Halliwell, 2001). ROS include free radicals, such as the superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>), peroxy radical (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>), as well as nonradical species, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell, 2001). An amount of ROS is necessary for physiological processes, including phagocytosis (Dupré-Crochet, Erard, & Nüße, 2013), intracellular signalling (Halliwell, 2001), cell proliferation, metabolism, apoptosis and muscle contraction (Linnane, Zhang, & Yarovaya, 2002). Some of the main endogenous sources of free radicals are the mitochondrial respiratory chain, inflammation, peroxisomes and the cytochrome P450 (Valko et al., 2007). Excessive production of ROS can lead to oxidative stress, a pathophysiological condition, implicated in oxidative damage of macromolecules (lipids, protein, DNA) (Halliwell, 2001; Mylonas & Kouretas, 1999), immune dysfunction (Schneider & Tiidus, 2007), muscle damage (Nikolaidis et al., 2007) and fatigue (Meeus, Nijs, Hermans, Goubert, & Calders, 2013).

Skeletal muscle is susceptible to ROS injury, even under physiological conditions, such as exercise (Nikolaidis et al., 2008). Skeletal muscle has the unique ability to increase the rate of oxygen usage during contraction. During intense activity, the high rate of O<sub>2</sub> consumption (VO<sub>2</sub>) in skeletal muscles can cause incomplete oxygen reduction and electron leakage from the electron transfer chain, leading to the generation of ROS (Hood, Uguccioni, Vainshstein, & D'souza, 2011). Together with nitric oxide and its reaction products, these nitrogen and oxygen species cause oxidative stress leading to muscle damage. Both muscle damage and exercise-induced oxidative stress have been associated with muscle cell apoptosis (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). At the same time, fatigue, which may be a symptom of skeletal muscle cell damage, has also been associated with oxidative stress (McClung et al., 2010). Due to the fact that oxidative stress may be responsible for muscle soreness and fatigue and even skeletal muscle damage, it has been suggested that antioxidant supplementation may relieve the problem (Kerasioti et al., 2012).

Muscle cells, like all eukaryotic cells, are equipped with antioxidant defence mechanisms to deal with ROS. The antioxidant mechanisms include enzymatic and non enzymatic. For example, important antioxidant enzymes are catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Powers & Jackson, 2008). The non enzymatic mechanisms include antioxidant molecules such as glutathione, coenzyme Q<sub>10</sub>, α-lipoic acid, selenium and bilirubin as

\* Corresponding author. Tel.: +30 2410 565277; fax: +30 2410 565290.

E-mail addresses: e-fthalia@hotmail.com (E. Kerasioti), stagkos@med.uth.gr (D. Stagos), alexandros.priftis@hotmail.com (A. Priftis), asnf19@hotmail.com (S. Aivazidis), aris@med.uoc.gr (A.M. Tsatsakis), awhayes@spherix.com (A.W. Hayes), dkouret@uth.gr (D. Kouretas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>

0308-8146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

well as exogenous antioxidants received from the diet (e.g. vitamin C, vitamin E, flavonoids) (Wu, Fang, Yang, Lupton, & Turner, 2004).

In an effort to increase antioxidant defense and protect the organism from the harmful effects of oxidative stress, there is an increased interest for natural sources of antioxidants. For example, whey is a popular dietary protein supplement augmenting antioxidant defense (Bartfay, Davis, Medves, & Lugowski, 2003; Kerasiotti et al., 2012). It is considered as by-product of cheese manufacturing, but it is also described as functional food with nutritional applications (Marshall, 2004; Tseng et al., 2006). It is usually used as a food supplement especially by athletes for muscle growth. The components of whey include beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins, lactoperoxidase enzymes, glycomacropetides and lactose (Walzem, Dillard, & German, 2002). Some of these components exhibit antioxidant properties. For example, alpha-lactalbumin can chelate heavy metals, leading to the reduction of oxidative stress because of its iron-chelating properties (Ha & Zemel, 2003). Moreover, whey protein is rich in the sulphur-containing amino acids, cysteine and methionine, that enhance antioxidant defence through intracellular conversion to glutathione (Marshall, 2004).

In previous *in vivo* studies, we have shown that a cake containing sheep whey protein had antioxidant, as well as anti-inflammatory, activities in human beings, subjected to intense exercise (Kerasiotti et al., 2012, 2013). The aim of the present study was to compare *in vitro* antioxidant activity of sheep whey protein with that of other proteins (i.e. beef protein, soy protein and cow whey protein) used as food supplements for muscle growth. Moreover, we investigated the effects of sheep whey protein against tert-butyl hydroperoxide (tBHP) – induced oxidative stress in mouse muscle cells C2C12.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals, reagents and culture medium

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS) and trypsin were purchased from Gibco (Grand Island, NY). Tert-butyl hydroperoxide (tBHP), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt (ABTS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solution 30%, horseradish peroxidase (HRP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric chloride, 2-deoxyribose, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), mercury orange and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid (TCA) and 2-thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Cell proliferation kit II (XTT) was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) and potassium ferri-cyanide was obtained from Applichem (Dresden, Germany).

### 2.2. DPPH<sup>•</sup> radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging activity of proteins was evaluated as described previously (Spanou et al., 2007). Briefly, a 1.0 ml freshly made methanolic solution of DPPH radical (100 μM) was mixed with the tested proteins dissolved in distilled water at different concentrations. The contents were vigorously mixed, incubated at room temperature in the dark for 20 min and the absorbance was read at 517 nm. In each experiment the tested protein alone in methanol was used as blank and the DPPH<sup>•</sup> alone in methanol was used as control. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions. The DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity was calculated according to the equation:

### % DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity

$$= [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

where  $Abs_{control}$  and  $Abs_{sample}$  are the absorbance values of the control and the tested sample respectively.

### 2.3. ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging assay

ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity was measured as described previously (Spanou et al., 2007). The reaction was carried out in 1 ml final volume, containing 400 μl H<sub>2</sub>O, 500 μl ABTS (1 mM), 50 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM) and 50 μl HRP (6 μM). Immediately after the addition of the enzyme the contents were mixed and incubated at room temperature in the dark for 45 min. After incubation, the tested proteins dissolved in distilled water (10 μl) at different concentrations were added, the contents were mixed and the absorbance was measured at 730 nm. In each experiment the samples without HRP were used as blanks, and the samples without protein were used as control. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions. The ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity was calculated according to the equation:

### % ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity

$$= [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

where  $Abs_{control}$  and  $Abs_{sample}$  are the absorbance values of the control and the tested sample respectively.

### 2.4. Hydroxyl (OH<sup>•</sup>) radical scavenging assay

Hydroxyl (OH<sup>•</sup>) radical scavenging activity was determined using the method of Chung, Osawa, and Kawakishi (1997). 75 μl of protein dissolved in distilled water at different concentrations were added to 450 μl sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4), 150 μl 2-deoxyribose (10 mM), 150 μl FeSO<sub>4</sub>-EDTA (10 mM), 525 μl H<sub>2</sub>O and 150 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), and the samples were incubated at 37 °C for 4 h. After incubation, 750 μl TCA (2.8%) and 750 μl 2-thiobarbituric acid (1%) were added and the samples incubated at 95 °C for 10 min. The samples were cooled on ice for 5 min and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 25 °C. The absorbance was measured at 520 nm. In each experiment, the samples without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as blank and the samples without protein were used as control. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions. The OH<sup>•</sup> radical scavenging activity was calculated according to the equation:

### % OH<sup>•</sup> radical scavenging activity

$$= [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

where  $Abs_{control}$  and  $Abs_{sample}$  are the absorbance values of the control and the tested sample respectively.

### 2.5. Superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radical scavenging assay

Superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radical scavenging activity was determined according to the method of Gülçin, Küfrevioğlu, Oktay, and Büyükkökuroğlu (2004). Briefly, in 2.5 ml trishydroxymethylaminomethane hydrochloride (Tris-HCl) (16 mM, pH 8.0), 500 μl of NBT (300 μM), 500 μl of NADH (468 μM) and 250 μl of proteins dissolved in distilled water at different concentrations were added. The reaction was started by adding 500 μl PMS (60 μM). The samples were incubated for 5 min and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 25 °C. The absorbance was measured at 560 nm. In each experiment, the samples without PMS were used as blanks and the samples without protein were used as controls. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate

occasions. The superoxide ( $O_2^-$ ) radical scavenging activity was calculated according to the equation:

$$\% \text{ superoxide } (O_2^-) \text{ radical scavenging activity} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

where  $Abs_{\text{control}}$  and  $Abs_{\text{sample}}$  are the absorbance values of the control and the tested sample respectively.

#### 2.6. Reducing power assay

Reducing power was determined according to Yen and Duh (1994). Briefly, the proteins were dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) at different concentrations. An aliquot (2.5 ml) of the sample solution was added to 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%) and incubated at 50 °C for 20 min. The samples were cooled on ice for 5 min. Then, 2.5 ml TCA (10%) were added and the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 25 °C. To the supernatant (2.5 ml), 2.5 ml deionized water and 500  $\mu$ l ferric chloride (0.1%) were added and the samples were incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 700 nm. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions.

#### 2.7. Cell culture

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> muscle cells were a gift from Prof. Koutsilieris (National and Kapodistrian University of Athens, Greece). All cells were cultured in normal Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UK), containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine (Gibco, UK), 100 units/ml of penicillin, and 100 units/ml of streptomycin (Gibco, UK) in plastic disposable tissue culture flasks at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.8. Cell viability assay

Cell viability was assessed using the XTT assay kit (Roche, Germany). Briefly, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells were subcultured into a 96-well plate with  $1 \times 10^4$  cells per well in DMEM medium. After 24 h incubation, the cells were treated with increasing concentrations of proteins in serum-free DMEM medium for 24 h. 50  $\mu$ l of XTT test solution, which was prepared by mixing 50  $\mu$ l of XTT-labelling reagent with 1  $\mu$ l of electron coupling reagent, was then added to each well. After 4 h of incubation, the absorbance was measured at 450 nm and also at 690 nm as a reference wavelength in a Bio-Tek ELx800 microplate reader (Winooski, VT, USA). Cell cultures in DMEM serum-free medium were used as a negative control. Also, the absorbance of each protein concentration alone in DMEM serum-free medium and XTT test solution was tested at 450 nm. The absorbance values shown by the proteins alone were subtracted from those derived from C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cell treatment with proteins. Data was calculated as percentage of inhibition by the following formula:

$$\text{inhibition } (\%) = [(O.D._{\text{control}} - O.D._{\text{sample}}) / O.D._{\text{control}}] \times 100$$

where O.D.<sub>control</sub> and O.D.<sub>sample</sub> indicated the optical density of the negative control and the tested compounds respectively. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions.

#### 2.9. Treatment of C2C12 cells

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks for GSH, ROS and 75 cm<sup>2</sup> culture flasks for TBARS determination and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, the medium was removed and replaced with serum-free medium containing sheep whey protein at

different concentrations (0–6.24 mg of protein/ml), followed by incubation for 24 h. The untreated cells were considered as controls. After incubation, the whey protein was removed and tBHP (0.3 mM) was added for 30 min. The cells were then trypsinized, collected and centrifuged twice at 300g for 10 min at 5 °C. After each centrifugation the supernatant was discarded and the cellular pellet was resuspended in PBS. After the second centrifugation the supernatant was used for the measurement of oxidative stress markers, namely GSH, ROS and TBARS.

#### 2.10. Flow cytometric analysis of GSH and ROS levels

The intracellular GSH and ROS levels were assessed by flow cytometry using mercury orange and DCF-DA respectively. In particular, the fluorescent mercury orange binds directly to GSH, whilst DCF-DA within cells is deacetylated by esterases, and further converted to fluorescent DCF by oxidative action of ROS. A 400  $\mu$ M stock solution of mercury orange was made up in acetone and stored at 4 °C, while a fresh 400  $\mu$ M stock solution of DCF-DA was prepared in methanol. To assess the GSH and ROS levels, the cells were resuspended in PBS at  $1 \times 10^5$  cells per ml and incubated in the presence of mercury orange (40  $\mu$ M) or DCF-DA (10  $\mu$ M) in the dark at 37 °C for 30 min. The cells were then washed, resuspended in PBS and submitted to flow cytometric analysis using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA) with excitation and emission at 488 and 530 nm for ROS, and at 488 and 580 nm for GSH. Also, forward angle and right angle light scattering showing the cells size and cell internal complexity respectively were measured. Cells were analysed at a flow rate of 1000 events per second. Analyses were performed on 10,000 cells per sample and fluorescence intensities were measured on a logarithmic scale of four decades of the log of fluorescence. Data was analysed using BD Cell Quest software (Becton Dickinson). Each experiment was repeated at least three times.

#### 2.11. Assessment of TBARS levels by spectrophotometry

For TBARS determination, a slightly modified assay of Keles, Taysi, Sen, Aksoy, and Akcay (2001) was used. 400  $\mu$ l of cellular suspension or 400  $\mu$ l of PBS for blank was mixed with 500  $\mu$ l of 35% TCA and 500  $\mu$ l of tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) (200 mM, pH 7.4) and incubated for 10 min at room temperature. Afterwards, 1 ml of 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 55 mM thiobarbituric acid solution was added and the samples were incubated at 95 °C for 45 min. The samples were cooled on ice for 5 min and vortexed after adding 1 ml of 70% TCA. The samples were then centrifuged at 15,000g for 3 min and the absorbance of the supernatant was read at 530 nm. The assay requires more than 30  $\mu$ g absolute amount of protein in the test sample. Total protein in cellular suspension was assayed using a Bradford reagent from Sigma-Aldrich. Calculation of TBARS concentration was based on the molar extinction coefficient of malondialdehyde.

#### 2.12. Statistical analysis

Data was analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple pairwise comparisons. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . For all statistical analyses SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) was used. Data is presented as mean  $\pm$  SEM.



### 3. Results

#### 3.1. Scavenging of free radicals

All tested proteins scavenged dose dependent DPPH, ABTS and OH radicals (Fig. 1A–C). However the superoxide radical was scavenged only by beef protein (Fig. 1D).

For each protein the  $IC_{50}$  showing the concentration that has the ability to scavenge 50% of radicals was evaluated. A lower  $IC_{50}$  value corresponds to a larger scavenging activity. The  $IC_{50}$  values in DPPH radical scavenging assay were in the following order: beef protein > soy protein > sheep whey protein > cow whey protein. For ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging assay the order was: beef protein > soy protein > cow whey protein = sheep whey protein. For Hydroxyl (OH<sup>•</sup>) radical scavenging assay the order was: beef protein > soy protein > cow whey protein = sheep whey protein. Concerning the superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), only beef protein exhibited scavenging activity.

#### 3.2. Reducing power

For the reducing power assay, it was determined the  $RP_{0.5AU}$ , the concentration that produces an absorbance of 0.5 at 700 nm (Fig. 2). The  $RP_{0.5AU}$  values in reducing power assay were in the following order: beef protein > sheep whey protein > soy protein > cow whey protein. For comparison purposes RP has been included in Table 1.

#### 3.3. Effects of whey protein on GSH levels in C2C12 cells

For assessing the effects of sheep whey protein on GSH, ROS and TBARS levels in C2C12 cells, non-cytotoxic concentrations (0.78–6.24 mg of protein/ml) were used (Fig. 3).

The GSH levels were evaluated by flow cytometry using mercury orange for staining as described in 'Section 2'. Histograms demonstrating the cell counts versus fluorescence of mercury

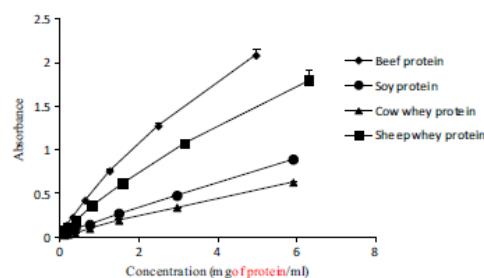


Fig. 2. Reducing power of beef protein, soy protein, whey protein and commercial whey protein. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

orange are shown in Fig. 4A. The mean fluorescent intensity was evaluated using the BD Cell Quest software and the values are presented as percentage of the control (untreated cells) (Fig. 5A). TBHP treatment decreased significantly GSH levels by 31.5% compared to the controls (Fig. 5A). However, treatment of C2C12 cells with whey protein, at concentrations of 0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg of protein/ml, before tBHP administration increased GSH levels by 25.7%, 112.9%, 118.0% and 138.0%, respectively compared to tBHP treatment alone (Fig. 5A).

#### 3.4. Effects of whey protein on ROS levels in C2C12 cells

ROS levels were evaluated by flow cytometry using DCF-DA for staining. Histograms demonstrating the cell counts versus fluorescence of DCF-DA are shown in Fig. 4B. The mean fluorescence intensity values were evaluated using the BD Cell Quest software and are expressed as percentage of the control (untreated cells) (Fig. 5B). The administration of tBHP did not affect ROS levels compared to the control. However, treatment of C2C12 cells with whey

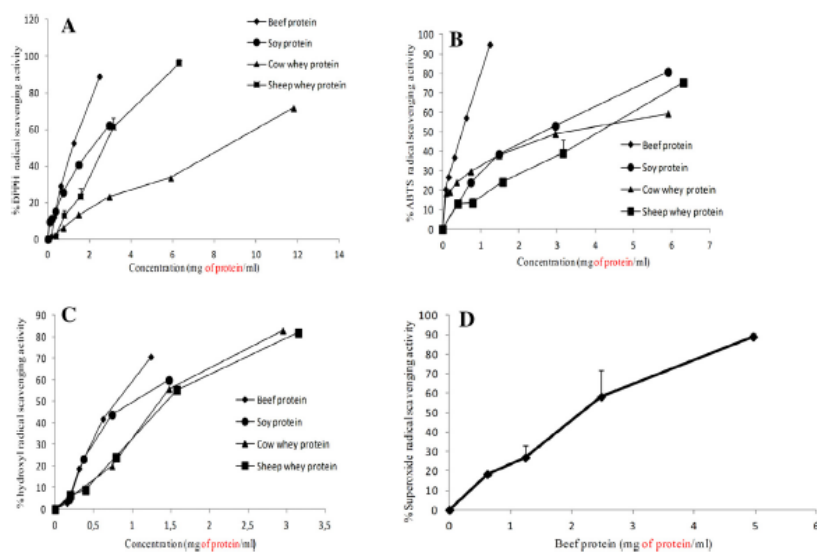


Fig. 1. (A) % DPPH radical scavenging activity of beef protein, soy protein, whey protein and commercial whey protein. (B) % ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity of beef protein, soy protein, whey protein and commercial whey protein. (C) % Hydroxyl (OH<sup>•</sup>) radical scavenging activity of beef protein, soy protein, whey protein and commercial whey protein. (D) % Superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) radical scavenging activity of beef protein. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

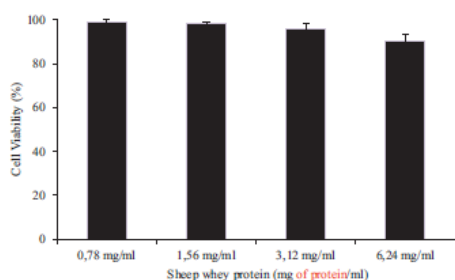
**Table 1**  
Free radical scavenging activity against DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, OH<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals as well as reducing power of beef protein, soy protein, sheep whey protein and cow whey protein.

Proteins	DPPH <sup>•</sup>	ABTS <sup>•+</sup>	OH <sup>•</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Reducing power <sup>a</sup>
	IC50 (mg of protein/ml)	IC50 (mg of protein/ml)	IC50 (mg of protein/ml)	IC50 (mg of protein/ml)	RP <sub>0.5AU</sub>
Beef protein	1.3 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.04 <sup>b</sup>
Soy protein	2.2 ± 0.44 <sup>c</sup>	3.1 ± 1.4 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.47 <sup>c</sup>	–	3.1 ± 1.7 <sup>c</sup>
SWP	3.1 ± 0.09 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.21 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.28 <sup>c</sup>	–	1.3 ± 0.06 <sup>c</sup>
CWP	8.2 ± 0.77 <sup>d</sup>	3.9 ± 0.13 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.14 <sup>c</sup>	–	4.8 ± 0.03 <sup>c</sup>

SWP: sheep whey protein, CWP: cow whey protein.

<sup>a</sup> Values are presented as mean ± sd of at least three independent experiments.

<sup>b</sup> P < 0.05.

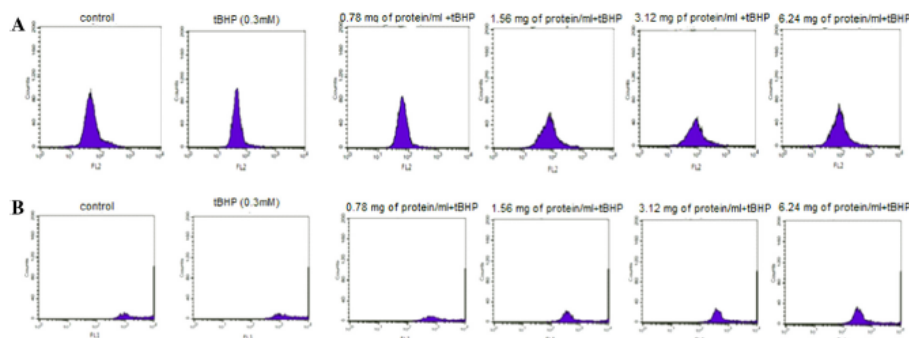


**Fig. 3.** Effects of sheep whey protein on viability of C2C12 cells.

protein, at concentrations of 1.56, 3.12 and 6.24 mg of protein/ml, before tBHP administration decreased significantly ROS levels by 12.8%, 16.4% and 41.3% respectively, compared to tBHP treatment alone (Fig. 5B).

### 3.5. Effects of whey protein on TBARS levels in C2C12 cells

The results showed that tBHP treatment increased significantly TBARS levels by 29% compared to control. Pre-treatment of cells with whey protein at 0.78–6.4 mg of protein/ml before tBHP administration led to a significant decrease in TBARS levels by 21.7%, 15%, 25.5% and 24% respectively (Fig. 5C).



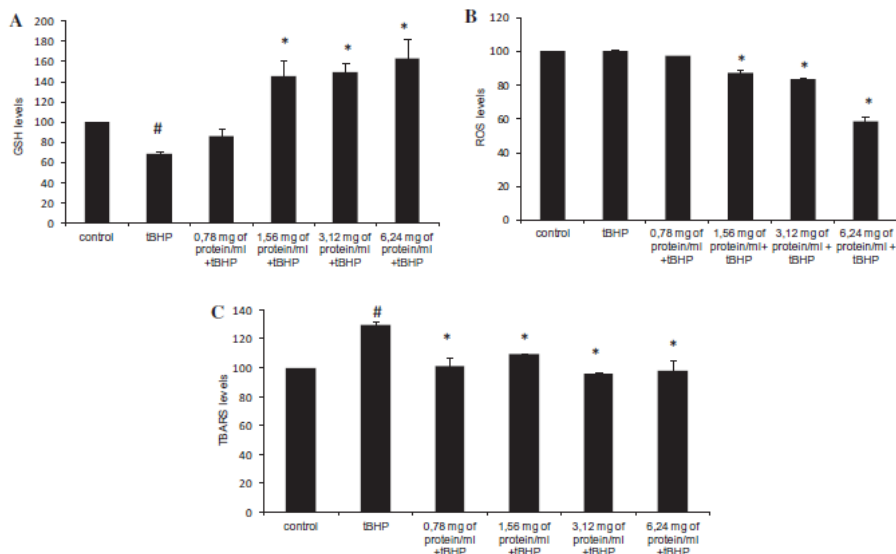
**Fig. 4.** Flow cytometry analysis in C2C12 cells. (A) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analysed by the flow cytometer for the detection of GSH. FL2 represented the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelength respectively. (B) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analysed by the flow cytometer for the detection of ROS. FL1 represented the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelength respectively. For ROS and GSH measurement, C2C12 cells were incubated with 10 μM DCF-DA and 40 μM mercury orange respectively for 30 min at 37 °C. The cells were then washed, suspended in PBS and analysed by flow cytometry, as described in Section 2.

## 4. Discussion

The overproduction of free radicals in organisms can cause oxidative stress, a pathophysiological condition which is associated with several diseases (Valiko et al., 2007). Living organisms are equipped with endogenous antioxidant defense mechanisms to cope with free radicals and oxidative stress, but also exogenous sources of antioxidants are important.

Whey protein is a by-product of cheese manufacturing which is widely used as a food supplement, especially by athletes for muscle growth. However, apart from whey protein's effects on muscle regeneration, we and others have shown that sheep whey protein possess antioxidant activity (Kerasiotti et al., 2012; Xu, Liu, Xu, & Kong, 2011). In the present study we compared the *in vitro* antioxidant activity of sheep whey protein with other proteins used frequently as food supplements for muscle growth. Moreover we investigated the effects of sheep whey protein on the redox status of muscle cells.

At first, it was examined the scavenging activity of sheep whey protein against DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, OH<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals. Then the scavenging activity of sheep whey protein was compared with that of beef protein, soy protein and cow whey protein. The protein content of beef, soy, cow whey and sheep whey protein was 62, 73.8, 73.8 and 78 g/100 g respectively. Regarding the DPPH<sup>•</sup> radical, sheep whey protein showed dose dependent scavenging activity and it was more effective than cow whey protein. However, beef protein was the most effective among all the tested proteins. In a previous study, it was found that whey protein at a concentration of 1 mg/ml, inhibited DPPH<sup>•</sup> radical by 70%. This whey protein was more effective than ours maybe due to its hydrolysis (Kamau & Lu,



**Fig. 5.** Effects of whey protein on GSH levels (A), ROS levels (B) and TBARS levels (C) in C2C12 myoblasts. Cells were studied under three conditions: under normal conditions (control), under treatment with tBHP (0.3 mM) for 30 min and under the combination of whey protein (0.78–6.24 mg of protein/ml) for 24 h and tBHP (0.3 mM) for 30 min. GSH and ROS levels were assessed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity is presented. TBARS levels were evaluated by spectrophotometer. All values are presented as the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments. \* Statistically significant compared to tBHP alone ( $P < 0.05$ ). # Statistically significant compared to control ( $P < 0.05$ ).

2011). Moreover, in ABTS<sup>+</sup> assay, sheep whey protein showed dose-dependent scavenging activity. Cow whey protein exhibited similar action with sheep whey protein against ABTS<sup>+</sup> radicals. However, like the DPPH assay, beef protein had the highest scavenging activity against ABTS<sup>+</sup> radicals. Apart from DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals, the free radical scavenging activity of proteins against hydroxyl and superoxide radicals which are present in living organisms were also examined. In particular, hydroxyl (OH<sup>•</sup>) radicals are highly reactive and can damage all types of macromolecules (carbohydrates, lipids, amino acids). These radicals react with nucleotides in DNA and cause strand breakage leading to carcinogenesis, mutagenesis and cytotoxicity (Halliwell, 2001). The sheep whey protein scavenged OH<sup>•</sup> radical with an IC<sub>50</sub> value similar to that of cow whey protein. Like DPPH and ABTS assays, beef protein had the lowest IC<sub>50</sub> value against OH<sup>•</sup>. Superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radicals have been observed to kill cells, inactivate enzymes, and degrade DNA, cell membranes, and polysaccharides. These radicals may also play an important role in the peroxidation of unsaturated fatty acids and possibly other susceptible substances (Halliwell, 2001). In the superoxide scavenging assay, beef protein was shown to be not only the most potent as demonstrated in the other assays, but it was the only one that scavenged O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals. The fact that only one of the tested proteins scavenged O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals may be explained by the low rate of reaction of this radical with amino acids as well as by its short half-life (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Apart from the free radical scavenging activity, the reducing power of the tested proteins was also examined. The reducing power of a substance is associated with its antioxidant activity, since it indicates that the substances are electron donors and can reduce the oxidised intermediates of the lipid peroxidation processes, so that they can act as primary and secondary antioxidants (Chanda & Dave, 2009). The sheep whey protein at increasing concentrations showed increased reducing power. Like the free radical

scavenging assays, beef protein exhibited the highest reducing power activity. As it seems from the above results, beef protein was the most effective of all with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.6–2.5 mg/ml. The high radical scavenging activity of beef protein may be due to its amino acid content. It has been suggested that proteins exhibiting high antioxidant activity have a high content of amino acids that are very labile to oxidation, and so can potentially scavenge radicals before they are able to attack and damage other macromolecules (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). Amino acids that are very oxidizable are those with sulfur groups (cysteine and methionine) or aromatic side chains (tryptophan, tyrosine, and phenylalanine) from which hydrogen is easily removed (Elias et al., 2008).

As mentioned above, since sheep whey protein exhibits antioxidant activity, we investigated its potential protective activity against tBHP-induced oxidative stress in muscle cells. Cells are equipped with antioxidant defence mechanisms to deal with the excessive production of ROS. For example, glutathione (GSH), the most abundant non-protein thiol source in the cells, is an important intracellular antioxidant that protects against oxidative stress. About 20% of intracellular GSH is located in the mitochondria where it helps protect from ROS produced as by-products of the electron transport chain (Livingstone & Davis, 2007). GSH exerts its antioxidant action by donating a hydrogen atom to a variety of radicals (Yu, 1994), serving as a substrate for glutathione peroxidase (GPX) to eliminate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Meister & Anderson, 1983) and reducing other antioxidants in the cell such as vitamin E (Reddy, Scholz, Thomas, & Massaro, 1982). GSH levels after incubation with tBHP only, decreased significantly by 31.5%. It has been reported that tBHP oxidises GSH through the action of glutathione peroxidase (GPX) and leads to increased levels of GSSG (Lima, Fernandes-Ferreira, & Pereira-Wilson, 2006). Treatment of cells with sheep whey protein before tBHP administration led to an increase



in GSH levels compared to tBHP alone treatment. Our results are consistent with those of previous studies. In particular, Xu et al. (2011) showed that treatment of C2C12 cells with 0.5 mg/ml whey protein, under the influence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), increased GSH levels by 341% compared to  $H_2O_2$  alone treatment. In another study, administration of 0.1, 1 and 10 mg/ml of whey protein, before ethanol exposure in pheochromocytoma cell line (PC12), increased GSH levels by 20%, 43% and 98% respectively (Tseng et al., 2006). The effect of whey protein on GSH levels is associated with its high content in cysteine. Cysteine is one of the three amino acids of GSH and determines the rate of GSH biosynthesis (Lu, 1999). There is a competition for the use of cysteine either for GSH production or for protein synthesis, with the second to be favoured when the levels of the amino acid in the cell are low. Therefore, if a cysteine rich protein, like whey protein, is taken through the diet, then biosynthesis of GSH will be induced. Furthermore, whey protein appears to induce the synthesis of glutathione peroxidase which converts GSSG into GSH (Xu et al., 2011).

Moreover, the effects of sheep whey protein on TBARS levels was studied (a marker of lipid peroxidation). Treatment of C2C12 cells with tBHP increased significantly TBARS levels by 29%. TBHP reacts with  $Fe^{2+}$  leading to the formation of tert-butyl-hydroperoxyl (tBO $\cdot$ ) radicals. Both the generated tBO $\cdot$  radicals and the interaction of tBHP with GSH have been associated with lipid peroxidation (Alia, Ramos, Mateos, Bravo, & Goya, 2005; Lima et al., 2006). The treatment of muscle cells C2C12 with sheep whey protein decreased tBHP-induced increase of TBARS levels. Interestingly, in a previous study, we have shown that a cake containing sheep whey protein decreased plasma TBARS levels in athletes after intense exercise (Kerasioti et al., 2012). Moreover, Xu et al. (2011) showed that in C2C12 cells whey protein at 0.5 mg/ml inhibited by 67% hydrogen peroxide-induced increase of malondialdehyde (MDA) levels, a marker of lipid peroxidation.

Regarding the ROS levels, tBHP treatment had no effect. This may be due to neutralization of free radicals by the antioxidant mechanisms of the cell (e.g. GSH) and/or to reaction with other molecules. Thus, although tBHP produces free radicals, their "free form" cannot be observed. For example, we observed a decrease in GSH and an increase in lipid peroxidation after tBHP treatment indicating that free radicals reacted with GSH and lipids. Treatment of C2C12 cells with sheep whey protein before tBHP administration led to a decrease in ROS levels up to 41.30% compared to tBHP treatment alone. Moreover, in another study, whey protein isolate (pWPI) and whey protein native hydrolysates (nWPI) at 2 mg/ml inhibited  $H_2O_2$ -induced ROS formation by 76% and 32.5% respectively in a human colonic adenocarcinoma (Caco-2) cell line (Piccolomini, Iskandar, Lands, & Kubow, 2012).

In conclusion, the present results showed that sheep whey protein was effective to scavenge free radicals and to protect muscle cells from oxidative stress-induced damage. Therefore, the results support our findings from previous *in vivo* studies suggesting that a supplement in a cake form containing sheep whey protein protected athletes from exercise-induced oxidative stress (Kerasioti et al., 2012). Moreover, the present results provide an explanation for the cellular mechanisms through which the sheep whey protein may exert its protective activity against oxidative stress, since it was observed an increase in GSH levels and a decrease in lipid peroxidation (i.e. TBARS levels) and ROS levels in C2C12 cells. Thus, the findings of the present study suggest that the use of sheep whey protein as food supplement for athletes may have not only effects on muscle growth but also antioxidant enhancement. Of course, more research is needed as concerns the molecular mechanisms through which whey protein acts as an antioxidant. For example, it has been shown that whey protein increases a number of antioxidant enzymes (Sukkar & Bounous, 2004), and thus we currently perform experiments to find out the molecular pathways involved in these effects.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heraclitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

## References

- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., & Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 119–127.
- Bartfay, W. J., Davis, M. T., Medves, J. M., & Lugowski, S. (2003). Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron overload cardiomyopathy. *Canadian Journal of Cardiology*, 19, 1163–1168.
- Chanda, S., & Dave, R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 981–996.
- Chung, S. K., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 118–123.
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüpe, O. (2013). ROS production in phagocytes: Why, when, and where? *Journal of Leucocyte Biology*, 94(4), 657–670.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, O. I., Oktay, M., & Büyükkökroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antitumor and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205–215.
- Ha, E., & Zemel, M. B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 251–258.
- Halliwel, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In J. Wiley & Sons (Ed.), *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group.
- Halliwel, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford Science Publications (Chapter 2).
- Hood, D. A., Ugucioni, G., Vainshtein, A., & D'souza, D. (2011). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Implications for health and disease. *Comprehensive Physiology*, 1, 1119–1134.
- Kamau, S. M., & Lu, R. R. (2011). The effects of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Current Research in Dairy Science*, 3, 25–35.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Canadian Journal of Neurological Science*, 28, 141–143.
- Kerasioti, E., Kiskini, A., Veskokouk, A., Jamurtas, A., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A. M., et al. (2012). Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2805–2810.
- Kerasioti, E., Stagos, D., Jamurtas, A., Kiskini, A., Koutedakis, Y., Goutzouras, N., et al. (2013). Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-whey protein cake after exhaustive cycling in humans. *Food and Chemical Toxicology*, 13, 61–66.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79, 2056–2068.
- Linane, A. W., Zhang, C., & Yarovaya, N. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 396–411.
- Livingstone, C., & Davis, J. (2007). Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 7, 258–265.
- Lu, S. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB Journal*, 13, 1169–1183.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136–156.
- McClung, J. M., Deruisseau, K. C., Whidden, M. A., Van Remmen, H., Richardson, A., Song, W., et al. (2010). Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Experimental Physiology*, 95, 222–231.
- Meeus, M., Nijs, J., Hemans, L., Goubert, D., & Gelders, P. (2013). The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: Peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17, 1081–1089.

- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760.
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13, 295–309.
- Nikolaïdis, M. G., Jamurtas, A. Z., Paschalis, V., Fatouros, I. G., Koutedakis, Y., & Kouretas, D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations. *Sports Medicine*, 38, 579–606.
- Nikolaïdis, M. G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A. Z., et al. (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 32, 197–205.
- Phaneuf, S., & Leeuwenburgh, C. (2001). Apoptosis and exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33, 393–396.
- Piccolomini, A. F., Iskandar, M. M., Lands, L. C., & Kubow, S. (2012). High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food & Nutrition Research*, 56.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88, 1243–1276.
- Reddy, C. C., Scholz, R. W., Thomas, C. E., & Massaro, E. J. (1982). Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sciences*, 31, 571–576.
- Schneider, B. S., & Tiidus, P. M. (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: How do we resolve the controversy? *Sports Medicine*, 37, 837–856.
- Spanou, C., Stagos, D., Tousias, L., Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., et al. (2007). Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using *in vitro* assays. *Anticancer Research*, 27, 3403–3410.
- Sukkar, S. G., & Bounous, G. (2004). The role of whey protein in antioxidant defense. *Rivista Italiana di Nutrizione Parenterale ed Enterale*, 22, 193–200.
- Tseng, Y. M., Lin, S. K., Hsiao, J. K., Chen, I. J., Lee, J. H., Wu, S. H., et al. (2006). Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 574–578.
- Valko, M., Leibfranz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- 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. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 42, 353–375.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134, 489–492.
- Xu, R., Liu, N., Xu, X., & Kong, B. (2011). Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *Journal of Dairy Science*, 94, 3739–3746.
- Yen, G. C., & Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74, 139–162.