



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας



ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της επίδρασης της χορήγησης καφεΐνης στη
δραστικότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση των
ερυθροκυττάρων**

**Study of the effect of caffeine administration on catalase activity
in erythrocytes**



Φάκου Πολυχρονία ΑΜ: 3519074

Πανταζόπουλος Θεοφάνης ΑΜ: 3519041

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Βεσκούκης Αριστείδης

Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης

Τρίκαλα, 2022-2023

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βεσκούκης Αριστείδης (Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης,
Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέτσιος Γεώργιος

Καθηγητής στην Κλινική Εργοφυσιολογία, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Τα πρώτα βήματα εξάπλωσης του καφέ	σελ.13
Εικόνα 1.2: Οι χώρες με την μεγαλύτερη κατανάλωση καφέ το 2020	σελ.16
Εικόνα 1.3: Χημική Δομή Καφεΐνης (1,3,7-Τριμεθυλοξανθίνης)	σελ.17
Εικόνα 1.4: Τρισδιάστατο Μοντέλο Χημικής Δομής Καφεΐνης (1,3,7-Τριμεθυλοξανθίνης) / Στερεοχημική Διάταξη	σελ.18
Εικόνα 1.5: Τρισδιάστατο Μοντέλο Χημικής Δομής Θεοφυλλίνης	σελ.19
Εικόνα 1.6: Μεταβολικό Μονοπάτι Καφεΐνης	σελ.21
Εικόνα 1.7: Κύριες Μεταβολικοί Οδοί Καφεΐνης	σελ.22
Εικόνα 1.8: Μόριο καφεΐνης και τυπική διεργασία αποκαφεΐνοποίησης	σελ.27
Εικόνα 1.9: Διαφοροποίηση μεταξύ χημικής δομής ενός σταθερού μορίου και μιας ελεύθερης ρίζας	σελ.28
Εικόνα 1.10: Επιπτώσεις από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών σε κυτταρικά συστατικά	σελ.29
Εικόνα 1.11: Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου και τα χαρακτηριστικά τους	σελ.30
Εικόνα 1.12: Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες δημιουργίας ελεύθερων ριζών	σελ.32
Εικόνα 1.13: Δράση των αντιοξειδωτικών στην καταστολή των ελευθέρων ριζών	σελ.33
Εικόνα 1.14: Σχηματικό διάγραμμα του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf-2 και Keap1	σελ.34
Εικόνα 1.15: Ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στα ερυθρά αιμοσφαίρια	σελ.36
Εικόνα 1.16: Τετραμερής Δομή της CAT	σελ.37
Εικόνα 1.17: Αντίδραση διάσπασης H ₂ O ₂ από καταλάση	σελ.38
Εικόνα 1.18: Μονομερής δομή της ανθρώπινης CAT, όπου φαίνεται ο θύλακας δέσμευσης του NADPH	σελ.39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1: Πειραματικός Σχεδιασμός	σελ.43
Σχήμα 3.2: Τα κριτήρια ένταξης των συμμετεχόντων	σελ.44
Σχήμα 3.3: Τα κριτήρια αποκλεισμού των συμμετεχόντων	σελ.44
Σχήμα 4.1: Η επίδραση της καφεΐνης στη δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των συμμετεχόντων	σελ.48

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AD	Alzheimer's disease / Νόσος Αλτσχάιμερ
ADI	Acceptable Daily Intake / Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη
CAT	Catalase / Καταλάση
DA	Dopamine / Ντοπαμίνη
EFSA	European Food Safety Authority / Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων
EGCG	Epigallocatechin Gallate / Γαλλική Επιγαλλοκατεχίνη
FDA	Food and Drug Administration / Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
GSH	Glutathione / Γλουταθειόνη
Hb	Hemoglobin / Αιμοσφαιρίνη
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide / Υπεροξείδιο του υδρογόνου

NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate / Φωσφορικό Δινουκλεοτιδικό Νικοτιναμίδιο Αδενίνης
Nrf-2	Nuclear factor erythroid-2 related factor-2
PD	Parkinson's disease / Νόσος Πάρκινσον
ROS	Reactive Oxygen Species / Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
SNP	Single Nucleotide Polymorphism / Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός
XO	Xanthine Oxidase / Οξειδάση της ξανθίνης
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Εργοφυσιολογίας και Διατροφής του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας κ. Βεσκούκη Αριστείδη, επίκουρο καθηγητή οξειδοαναγωγικής βιολογίας της διατροφής και της άσκησης, για την ιδιαίτερη καθοδήγηση και υποστήριξη που μας παρείχε, καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μας εργασίας. Είμαστε ευγνώμονες για την ευκαιρία που μας δόθηκε να ασχοληθούμε με την διεξαγωγή μιας ερευνητικής εργασίας και να εμπλακούμε τόσο ενεργά στον χώρο του εργαστηρίου. Οι γνώσεις και οι συμβουλές που αντλήσαμε από εκείνον, είναι πολύτιμες και θα μας φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες.

Επιπρόσθετα, και οι δύο εκφράζουμε την ευγνωμοσύνη για την άψογη συνεργασία και επικοινωνία που επικρατούσε μεταξύ μας.

Επιπλέον, ευχαριστούμε θερμά την ομάδα του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που αναπτύχθηκε, καθώς και τους εθελοντές για την προθυμία τους και την συμμετοχή τους στο πείραμα.

Τέλος, θέλουμε να εκφράσουμε την εκτίμηση μας τόσο στις οικογένειές μας για την υποστήριξη τους, όσο και στους φίλους μας για την συμβολή τους ως προς την επίτευξη αυτής της εργασίας.

“ If coffee is a poison , it is a slow poison ”

-Voltaire, Writer, philosopher, historian



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Καφές.....	13
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή του Καφέ	13
1.1.2 Είδη του καφέ	15
1.1.3 Παγκόσμια Κατανάλωση του Καφέ	15
1.2 Καφεΐνη	16
1.2.1 Ιστορική αναδρομή	16
1.2.2 Γενικά Χαρακτηριστικά	17
1.2.3 Προϊόντα που περιέχουν καφεΐνη.....	18
1.3 Βιοχημικά Χαρακτηριστικά της Καφεΐνης.....	20
1.3.1 Μηχανισμός Δράσης της Καφεΐνης	20
1.3.2 Μεταβολισμός της Καφεΐνης.....	20
1.3.3 Θετικές Επιδράσεις.....	23
1.3.4 Αρνητικές Επιδράσεις.....	23
1.3.5 Τοξικότητα της καφεΐνης	24
1.3.6. Κλινικές επιπλοκές της καφεΐνης.....	25
1.3.7 Καφές χωρίς καφεΐνη	26
1.4 Ελεύθερες Ρίζες	28
1.4.1 Ρόλος Ελεύθερων Ριζών.....	28
1.4.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου	30
1.4.3 Σχηματισμός και παραγωγή Ελευθέρων Ριζών	31
1.5 Αντιοξειδωτικά.....	32
1.5.1 Ένζυμα και μη ενζυμικοί μεταβολίτες.....	32
1.5.2 Μοριακός Μηχανισμός Nrf-2	33
1.6 Αίμα	35
1.6.1 Γενικά Χαρακτηριστικά	35
1.6.2 Ερυθροκύτταρα και αντιοξειδωτικός μηχανισμός	35
1.7 Καταλάση.....	36

1.7.1 Γενικά Χαρακτηριστικά της Καταλάσης.....	36
1.7.2 Ο μηχανισμός της καταλάσης και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, H ₂ O ₂	37
1.7.3 Αντιοξειδωτική δράση και δραστικότητα της CAT	40
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
3.1 Μεθοδολογία.....	42
3.1.1 Σχεδιασμός πειράματος.....	42
3.1.2 Συμμετέχοντες	43
3.1.3 Προμήθεια Καφέ	44
3.1.4 Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση αίματος.....	45
3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός	45
3.3 Στατιστική ανάλυση.....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
Δραστικότητα της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα.....	48
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	51
Βιβλιογραφία	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Ο καφές κατέχει στις μέρες μας μία ιδιαίτερη θέση στην καθημερινότητα των ανθρώπων. Η καφεΐνη, το κυριότερο συστατικό του καφέ, εντοπίζεται σε πολλά είδη ροφημάτων και τροφίμων. Είναι ευρέως διαδεδομένο νευροδιεγερτικό του οργανισμού, το οποίο εμφανίζει ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου, όταν λαμβάνεται σε αποδεκτές ποσότητες. Η αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική της δράση, με την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, την καθιστά ένα σημαντικό χημικό συστατικό. Η δραστηριότητα της καταλάσης, ενός αντιοξειδωτικού ενζύμου των ερυθροκυττάρων του αίματος φαίνεται να συσχετίζεται τα τελευταία χρόνια με τη χορήγηση καφεΐνης, λόγω των πολύπλοκων βιοχημικών ιδιοτήτων της.

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης στη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση (CAT) των ερυθροκυττάρων υγιών ατόμων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Οι συμμετέχοντες που προσήλθαν στο Εργαστήριο Κλινικής Εργοφυσιολογίας και Διατροφής του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας στα Τρίκαλα, χωρίστηκαν τυχαία και ισάριθμα με διπλά τυφλοποιημένο τρόπο σε ομάδα παρέμβασης (n=10) και ομάδα ελέγχου (n=10). Όλοι τους ήταν υγιείς ενήλικες άνδρες και γυναίκες, ηλικίας 18-45 ετών. Στην ομάδα παρέμβασης χορηγήθηκε ρόφημα καφέ με καφεΐνη σε δοσολογία 3 mg/kg σωματικού βάρους στην αρχή του πειράματος, ενώ στην ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε ρόφημα καφέ χωρίς καφεΐνη. Στη συνέχεια, λήφθηκε αίμα από τους συμμετέχοντες πριν την έναρξη του πειράματος και μια ώρα μετά από την κατανάλωση του ροφήματος. Τονίζεται ότι η συγκέντρωση της καφεΐνης στο αίμα είναι η μέγιστη κατά τη χρονική στιγμή της δεύτερης αιμοληψίας. Αφού συλλέχθηκαν τα δείγματα του αίματος, πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή ανάλυση, στην οποία έγινε φασματοφωτομετρική μέτρηση της δραστηριότητας της CAT.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Έπειτα από τις μετρήσεις στα δείγματα του αίματος και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε ότι η χορήγηση της καφεΐνης δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά ($p = 0,851$) τη δραστηριότητα της CAT των ερυθροκυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ / ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Το εύρημα αυτό δείχνει ότι στην παρούσα δοσολογία υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος, η καφεΐνη δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του προς μελέτη ενζύμου. Ωστόσο, περαιτέρω μετρήσεις σε άλλους δείκτες οξειδοαναγωγής

του αίματος ενδέχεται να προσφέρουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δράση της καφεΐνης ως πιθανού αντιοξειδωτικού.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Καφεΐνη, καφές, καταλάση, ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά, ερυθροκύτταρα.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Coffee nowadays is an important component of people's daily life. Caffeine, its main ingredient, is found in many types of beverages and foods. It is a widespread neurostimulant, which possesses multifaceted beneficial properties for human life, when administered in acceptable quantities. Its remarkable antioxidant activity through neutralizing free radicals, makes it an important chemical compound. The activity of catalase (CAT), an antioxidant enzyme of red blood cells, seems to be associated with caffeine administration, due to its complex biochemical properties.

AIM: The aim of the present study was to investigate the effect of caffeine administration on the activity of the antioxidant enzyme catalase present in the erythrocytes of healthy individuals.

METHODOLOGY: The participants who came into the Laboratory of Clinical Exercise Physiology and Nutrition of the Department of Nutrition and Dietetics in Trikala were divided randomly and equally in a double-blind manner into an intervention group (n=10) and a control group (n=10). All volunteers were healthy adult men and women, aged between 18 and 45 years. The intervention group was administered caffeinated coffee at a caffeine dosage equal to 3 mg/kg body weight at the beginning of the experiment, whereas the control group consumed a decaffeinated coffee drink. Blood samples were then collected from the participants before the start of the experiment and one hour after consuming the drink. Noteworthy, the concentration of caffeine in the blood reaches its maximum value one hour after consumption. After the blood samples were collected, laboratory analysis was performed in order to spectrophotometrically measure CAT activity in erythrocytes.

RESULTS: It was found that caffeine administration did not exert any statistically significant effect ($p = 0.851$) on the erythrocyte CAT activity of the participants.

DISCUSSION/CONCLUSIONS: The finding of this study shows that at the present dosage under the specific experimental conditions, caffeine does not affect CAT activity. However,

further measurements of the levels of other redox biomarkers may give insight regarding the action of caffeine as a potential antioxidant.

KEY WORDS: Caffeine, coffee, catalase, free radicals, antioxidants, red blood cells.

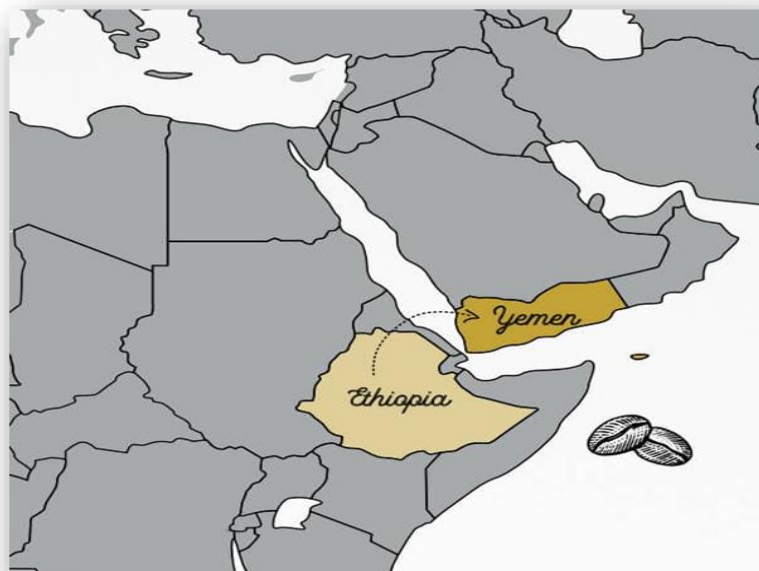


1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καφές

1.1.1 Ιστορική Αναδρομή του Καφέ

Ο καφές είναι ένα από τα πιο γνωστά, προτιμώμενα και ευχάριστα ροφήματα σε όλο τον κόσμο. Μάλιστα, πλέον δεν συνιστά προϊόν πολυτέλειας, όπως συνέβαινε σε πολλές χρονικές περιόδους στο παρελθόν, αλλά κατέχει σημαντική θέση στο διαιτολόγιο και την καθημερινή διατροφή πολλών ανθρώπων παγκοσμίως, ανεξαρτήτως κοινωνικού ή οικονομικού υποστρώματος (Ukers 1935). Σήμερα, συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο διαδεδομένων φαρμακολογικά δραστικών ροφημάτων και σύμφωνα με έρευνες είναι το δεύτερο πιο πολύτιμο εμπόρευμα μετά το πετρέλαιο. Η δημοφιλία του οφείλεται τόσο στην ευχάριστη γεύση που αποδίδει όσο και στις διεγερτικές επιδράσεις του, λόγω της ιδιαίτερης φυτοχημικής του σύστασης (Bae et al. 2014). Ο καφές διακατέχει σημαντική θέση στην ανθρώπινη κοινωνία για πάνω από 1200 χρόνια, με την ιστορική εξέλιξή του να είναι αρκετά ενδιαφέρουσα και μακροσκελής, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα τρόφιμο δεν αντιμετώπισε ποτέ τόσες αντιδράσεις και περιορισμούς.



Εικόνα 1.1: Τα πρώτα βήματα εξάπλωσης του καφέ <https://www.specialtycafetiere.com/history-of-coffee/>

Σύμφωνα με την ιστορία, η προέλευση του καφέ εντοπίζεται στα δάση και τα υψίπεδα της Αιθιοπίας, όπου συναντάται ευρέως το καφεόδεντρο, πριν από τον 10^ο αιώνα (Βερβερίδου 2021) (Εικόνα 1.1). Με βάση τη μυθολογία, η πρώτη εμφάνισή του τοποθετείται στον 9^ο αιώνα από έναν βοσκό, ο οποίος συμπέρανε ότι οι άγριοι καρποί του καφέ που κατανάλωναν οι κατσίκες του ήταν υπεύθυνοι για την αυξημένη τους ενέργεια (Willson 2018). Πιστεύεται ότι οι πρώτες καλλιέργειες εμφανίστηκαν από το 575 μ.Χ. μετά την περσική εισβολή στην Αιθιοπία (Ukers 1935). Παρόλα αυτά, η πρώτη αξιόπιστη αναφορά για την κατανάλωση και ευρεία χρήση του καφέ δεν συμβαίνει νωρίτερα από τον 15^ο αιώνα στην Υεμένη και την Αραβική Χερσόνησο, όπου εμφανίστηκαν και τα πρώτα καφεκοπτεία, τα οποία ήταν μέρη με σημαντική κοινωνική αξία (Καλαμαρίδη 2015). Οι Άραβες αποκαλούσαν τον καφέ kahwah, που είναι μια παλιά λέξη της γλώσσας τους για το κρασί (Crawford 1852). Η πόλη Μόχα έγινε κέντρο και το όνομά της έφτασε να υποδηλώνει γνωστό ρόφημα καφέ που συνδυάζεται με σοκολάτα (Fredholm 2011). Για ένα χρονικό διάστημα τα δενδρύλλια καφέ διακινούνταν μόνο μεταξύ των μουσουλμανικών λαών γύρω από τις ακτές του Ινδικού Ωκεανού και της Ερυθράς Θάλασσας, με τους Άραβες αρχικά να επιδιώκουν μονοπώλιο του φυτού, απαγορεύοντας την εξαγωγή του (Morris 2018). Το ονομαζόμενο "κρασί της Αραβίας" διαδόθηκε στον 15^ο αιώνα σε αρκετές ακόμα περιοχές, μεταξύ των οποίων είναι η Περσία, η Τουρκία, η Αίγυπτος, η Ινδία και η βόρεια Αφρική. Οι Ολλανδοί αποικιοκράτες έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του καφέ, που σε πολλές περιπτώσεις έγινε λαθραία (Καλαμαρίδη 2015). Οι Ευρωπαίοι ταξιδιώτες στην Εγγύς Ανατολή διέδιδαν ιστορίες στις πατρίδες τους για ένα ασυνήθιστο σκούρο ποτό και έτσι κοντά στον 18^ο αιώνα, το δημοφιλές ρόφημα άρχισε να καταφθάνει στη σημερινή Ευρώπη, τα Βαλκάνια και την Αμερική (Wolf et al. 2008). Η ιστορία της καλλιέργειας του καφέ κάθε ευρωπαϊκού έθνους είναι μοναδική. Στην ελληνική καθημερινότητα ο καφές ενσωματώθηκε κατά τη διάρκεια της Τουρκοκρατίας (Καλαμαρίδη 2015). Επιπλέον, μετατράπηκε σε βιομηχανικό προϊόν τον 19^ο, καθώς η ταχεία παραγωγή του στη Βραζιλία τροφοδότησε την ανάπτυξη μίας μαζικής καταναλωτικής αγοράς στις ΗΠΑ, ενώ μετά το 1950 έγινε παγκόσμιο εμπόρευμα (Morris 2018). Το 1908 εισέρχεται στην αγορά η πρώτη μηχανή ενστάλαξης, το 1933 η πρώτη αυτόματη μηχανή espresso που κατασκευάζεται στην Ιταλία, ενώ το 1955 εφευρέθηκε ο στιγμιαίος καφές (Δημούλα 2021). Σήμερα, περισσότερες από 70 χώρες καλλιεργούν αυτό το φυτό, με τις κύριες χώρες παραγωγούς να είναι η Βραζιλία, η Κολομβία, η Αιθιοπία, η Ινδονησία και το Βιετνάμ.

1.1.2 Είδη του καφέ

Ο καφές προέρχεται από σπόρους, που η εξωτερική τους εμφάνιση θυμίζει μικρό στρογγυλό, κόκκινο κεράσι, το οποίο συλλέγεται από αειθαλείς θάμνους ή μικρά δέντρα, την Καφέα (coffea) ή αλλιώς καφεόδεντρο. Το φυτό αυτό ανήκει στην οικογένεια Rubiaceae, η οποία αποτελείται πάνω από 6.000 είδη. Ωστόσο, μόνο 60-70 ποικιλίες μπορούν να αποδώσουν καφέ (Καλαμαρίδη 2015). Οι κόκκοι αυτοί υποβάλλονται σε μία διαδικασία επεξεργασίας και δίνουν τον καφέ σε μορφή λεπτής σκόνης (Βερβερίδου 2021). Οι δύο κυριότερες ποικιλίες της παγκόσμιας παραγωγής καφέ, οι οποίες εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη γεύση, την εμφάνιση και την περιεκτικότητα σε καφεΐνη, είναι η Αράμπικα (Coffea Arabica) και η Ρομπούστα (Coffea Robusta). Ο καφές της ποικιλίας Ρομπούστα μάλιστα έχει 30-40 % περισσότερη καφεΐνη (Καλαμαρίδη 2015).

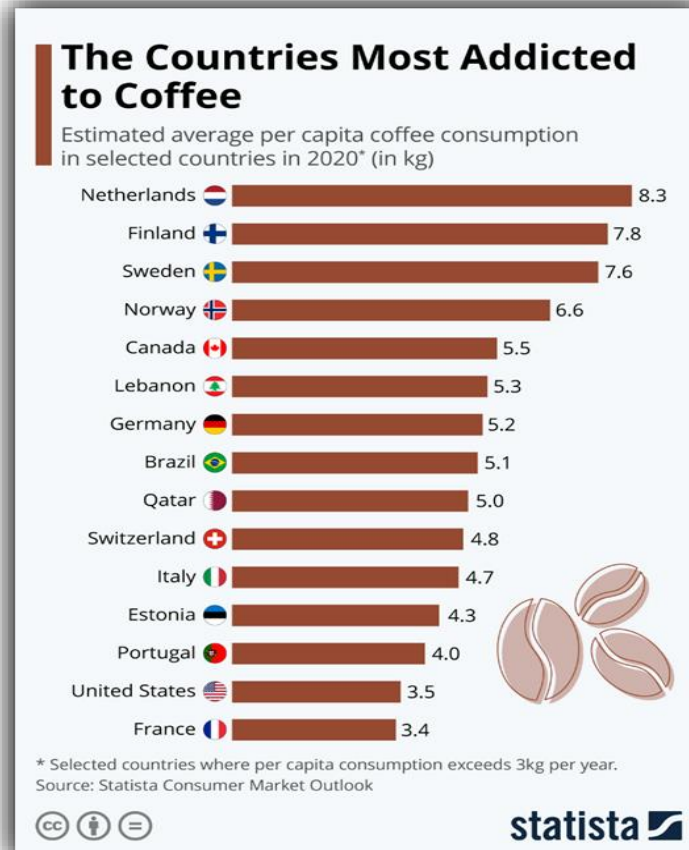
Τα είδη καφέ είναι πολλά και διαφέρουν ως προς την επεξεργασία, την παρασκευή και την ποικιλία των κόκκων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Ευρέως γνωστοί και με μεγάλη κατανάλωση καφέδες είναι ο ελληνικός καφές (ή τούρκικος), ο φραπέ, ο καφές φίλτρου (ή γαλλικός), ο εσπρέσσο, ο καπουτσίνο, ο κοζίτο, ο φροζίτο, ο ντεκαφεϊνέ (χωρίς καφεΐνη) και ο στιγμιαίος καφές σε σκόνη (Καλαμαρίδη 2015). Ο τελευταίος, είναι και ο πιο διαδεδομένος στην Ελλάδα, όπου και ανήκει και ο φραπέ. Η ποικιλία Αράμπικα θεωρείται ανώτερης ποιότητας από τον καφέ της ποικιλίας Ρομπούστα (Γεωργίου et al. 2022).

1.1.3 Παγκόσμια Κατανάλωση του Καφέ

Σύμφωνα με τα δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Καφέ (International Coffee Organization, ICO) για το έτος 2016, οι χώρες με τη μεγαλύτερη κατανάλωση ανά άτομο είναι η Φινλανδία με 12 kg/χρόνο, και ακολουθούν η Νορβηγία, η Ισλανδία, η Δανία και η Ολλανδία. Σύμφωνα με την Εικόνα 1.2, για το έτος 2020 η Ολλανδία βρίσκεται πρώτη στην κατανάλωση καφέ. Η Ελλάδα κατέχει την 32^η θέση, με την πρόσληψη καφέ να είναι κατά μέσο όρο 1.139.000 σάκους των 60 kg ο καθένας.

Η μέση συνολική ημερήσια πρόσληψη καφεΐνης σε όλες τις ηλικιακές ομάδες δεν υπερβαίνει τις συστάσεις της EFSA/EAAT (European Food Safety Authority / Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων) (3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για παιδιά και εφήβους και 400

mg/ημέρα για ενήλικες) (Verster & Koenig 2018). Πιο συγκεκριμένα, από δεδομένα της EFSA, ο καφές αποτελεί την πρωταρχική πηγή πρόσληψης καφεΐνης συνεισφέροντας μεταξύ 40% και 94% της συνολικής πρόσληψης ενηλίκων.



Εικόνα 1.2: Οι χώρες με την μεγαλύτερη κατανάλωση καφέ το 2020 <https://www.statista.com/chart/8602/top-coffee-drinking-nations/>

1.2 Καφεΐνη

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Ο πρώτος που κατόρθωσε να απομονώσει σε καθαρή μορφή την ουσία στην οποία οφείλεται η δράση του καφέ, δηλαδή την καφεΐνη, ήταν ο χημικός Friedrich Ferdinand Runge (1795-1865) το 1819. Η χημική σύσταση και η δομή της καφεΐνης αποσαφηνίστηκαν αργότερα από τον Hermann Emil Fischer (1852-1919), ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ. Βρήκε μέσω πειραμάτων ότι η καφεΐνη έχει παρόμοιο ετεροκυκλικό σκελετό με το ουρικό οξύ και στη συνέχεια διαπίστωσε ότι ήταν μία τριμεθυλοξανθίνη (Fredholm 2011).

1.2.2 Γενικά Χαρακτηριστικά

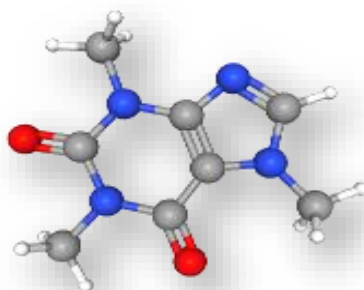
Βασικά συστατικά του καφέ είναι η καφεΐνη και οι πολυφαινόλες και κυρίως το χλωρογενικό οξύ το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα (Higdon & Frei 2006). Ωστόσο, μεταξύ των σημαντικότερων φαινολών εκτός από το χλωρογενικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ και οι κατεχίνες που διαθέτουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Grosso et al. 2016). Η καφεΐνη είναι η ουσία εκείνη με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως, χωρίς νομικούς περιορισμούς. Έχει φανεί, επίσης, ότι η κατανάλωση μέτριας ποσότητας αυξάνει την καθημερινή διαθέσιμη ενέργεια, μειώνει την κόπωση, ενισχύει την σωματική, κινητική και γνωστική απόδοση, βελτιώνει την αντανακλαστική ικανότητα και ενισχύει τη βραχυπρόθεσμη μνήμη (Glade 2010).



Εικόνα 1.3: Χημική Δομή Καφεΐνης (1,3,7-Τριμεθυλοξανθίνης) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine>

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) (Εικόνα 1.3) είναι ένα οργανικό αλκαλοειδές, παράγωγο της ξανθίνης (Fiani et al. 2021). Συνολικά, οι μεθυλοξανθινικές ενώσεις είναι η καφεΐνη, η θεοβρωμίνη, η θεοφυλλίνη και τα παράγωγά τους (PubChem Xanthine). Πιο συγκεκριμένα, η καφεΐνη είναι δομικά συγγενής με την αδενοσίνη και δρα κυρίως ως ανταγωνιστής των υποδοχέων της αδενοσίνης (NCI Thesaurus, n.d.). Από χημική άποψη, ο μοριακός τύπος της καφεΐνης είναι $C_8H_{10}N_4O_2$ και το μοριακό της βάρος είναι ίσο με 194,19 (PubChem Caffeine) (Εικόνα 1.4). Η καθαρή, άνυδρη καφεΐνη εμφανίζει πικρή γεύση, έχει

λευκή όψη, είναι άοσμη και έχει σημείο τήξης μεταξύ 235-238°C (PubChem Caffeine). Επειδή δεν περιέχει στερεογονικά κέντρα, η καφεΐνη ταξινομείται ως αχειρικό μόριο (Klosterman 2006).



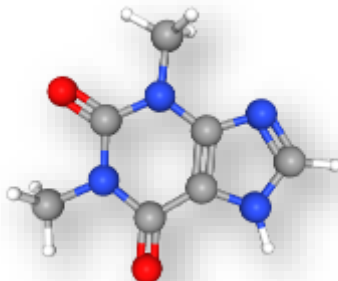
Εικόνα 1.4: Τρισδιάστατο Μοντέλο Χημικής Δομής Καφεΐνης (1,3,7-Τριμεθυλοξανθίνης) / Στερεοχημική Διάταξη
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine>

Ως παγκοσμίως διαδεδομένο συστατικό του καφέ, στο οποίο οφείλει τις ψυχοδιεγερτικές του ιδιότητες, η καφεΐνη δρα σαν ψυχοδραστικό φάρμακο. Ταξινομείται ως ένα φυσικό διεγερτικό του οργανισμού, το οποίο διεγείρει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) (Evans et al. 2022). Επιπλέον, η καφεΐνη φαίνεται ότι λαμβάνει μέρος και στην ντοπαμινεργική μετάδοση ενώ συμμετέχει στην απελευθέρωση της σεροτονίνης (Grosso et al. 2016). Σημαντική δράση της είναι αυτή του «εκκαθαριστή» ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα να θεωρείται ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό (Ko et al. 2020). Η καφεΐνη αποτελεί, επίσης, συστατικό ορισμένων φαρμάκων (Humans 1991). Η καφεΐνη είναι η πιο δραστική ουσία φαρμακολογικά στον κόσμο και εντοπίζεται πρωταρχικά στους κόκκους του καφέ (Nawrot et al. 2003). Παράλληλα, εντοπίζεται στα φύλλα του τσαγιού και κατ' επέκταση στο τσάι, στους κόκκους του κακάο, στα ενεργειακά ποτά (Grzegorzewski et al. 2022), ενώ η καφεΐνη αποτελεί πρόσθετο και σε άλλα αναψυκτικά και τρόφιμα (Nawrot et al. 2003).

1.2.3 Προϊόντα που περιέχουν καφεΐνη

Τσάι: Σύμφωνα με ιστορικά δεδομένα, το τσάι αποτελεί ένα από τα παλαιότερα ροφήματα που περιέχουν καφεΐνη (Barone & Roberts 1984). Το τσάι παρασκευάζεται από τα φύλλα του φυτού

Camellia Sinensis, με πρωταρχικά συστατικά της ποικιλίας του πράσινου τσαγιού τις κατεχίνες, το αμινοξύ L-θεανίνη και την καφεΐνη (Camfield et al. 2014). Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες που εντοπίζονται στο τσάι είναι η επιγαλλοκατεχίνη, η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (Epigallocatechin Gallate/ EGCG) και η γαλλική επικατεχίνη, στις οποίες οφείλονται οι αντιοξειδωτικές δράσεις του στον οργανισμό (Hursel et al. 2009). Μεθυλιωμένο παράγωγο της ξανθίνης και με παρόμοια χημική δομή με την καφεΐνη είναι η θεοφυλλίνη που φαίνεται στην Εικόνα 1.5, η κυριότερη ένωση που βρίσκεται στο πράσινο και το μαύρο τσάι (PubChem Theophylline). Επιπλέον, ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.) ορίζει στο άρθρο 54 ότι «το τσάι, είτε πράσινο είτε μαύρο, είναι τα φύλλα ή και οι οφθαλμοί φύλλων που έχουν ξεραθεί και έχουν κυλινδρωθεί με διάφορες μεθόδους και σπανιότερα οι οφθαλμοί ανθέων του τεϊόδεντρου THEA SINENSIS ή THEA ASSAMICA».



Εικόνα 1.5: Τρισδιάστατο Μοντέλο Χημικής Δομής Θεοφυλλίνης <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline>

Αναψυκτικά και Ενεργειακά Ποτά: Η πρώτη εισαγωγή ενεργειακών ποτών (Energy Drinks, ED), εμφανίστηκε κατά το 1990 με βασικό συστατικό τους την καφεΐνη (Wiklund et al. 2009). Τα ED εμφανίζουν υψηλή κατανάλωση ανάμεσα σε αθλητές, αφού βελτιώνουν την ενεργειακή τους κατάσταση και ενισχύουν τη σωματική τους απόδοση (Chtourou et al. 2019). Μελέτες, επίσης, έχουν δείξει ότι η πλειοψηφία των ανθρώπων δεν γνωρίζει την περιεκτικότητα πολλών αναψυκτικών (π.χ. τύπου κόλα) και ενεργειακών ποτών σε καφεΐνη (Verster & Koenig 2018). Τα περισσότερα προϊόντα αυτών των ποτών, καθώς και ορισμένων αναψυκτικών, περιέχουν ένα μείγμα ταυρίνης (ένα παράγωγο αμινοξέος), γλυκουρονολακτόνης και καφεΐνης (Seidl et al. 2000). Παράλληλα, σε αυτά περιέχεται σημαντική ποσότητα ζάχαρης, βιταμινών (π.χ. ριβοφλαβίνη, νιασίνη, βιταμίνη B6) και εκχυλισμάτων βοτάνων (Chtourou et al. 2019), που λειτουργούν ως συμπληρώματα (Steinke et al. 2009). Η ταυρίνη εμφανίζει ευεργετικές καρδιαγγειακές ιδιότητες λόγω της διαμεσολάβησής της στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του οργανισμού (Worthley et al. 2010).

Κακάο/Σοκολάτα: Η καφεΐνη εντοπίζεται φυσικά και σε ορισμένα είδη κόκκων κακάο (Evans et al. 2022). Οι πολυφαινόλες είναι μία ευρύτερη οικογένεια μορίων φυτικής προέλευσης που συμβάλλουν στη ρύθμιση της άμυνας του οργανισμού και σε αυτές ανήκουν και οι φλαβονόλες, που είναι και οι κυριότερες πολυφαινόλες του κακάο (Barrera-Reyes et al. 2019). Συγκεκριμένα, οι φλαβονόλες μαζί με την κατεχίνη και την επικατεχίνη ανήκουν στα φλαβονοειδή και αποτελούν συστατικά του κακάο (Garcia-Yu et al. 2020). Από χημική άποψη, η θεοβρωμίνη είναι το βασικό αλκαλοειδές των κόκκων του κακάο που περιέχεται στη σοκολάτα και σε άλλα τρόφιμα (PubChem Theobromine). Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των πολυφαινολών, και συγκεκριμένα των φλαβονοειδών, αποδίδονται στις λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου οι οποίες αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες (Kumar & Pandey 2013). Παρά τις ευεργετικές ιδιότητες που διαθέτει το κακάο, αμφιλεγόμενη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα καθώς δεδομένα προηγούμενων μελετών έρχονται σε αντιπαράθεση (Barrera-Reyes et al. 2019).

1.3 Βιοχημικά Χαρακτηριστικά της Καφεΐνης

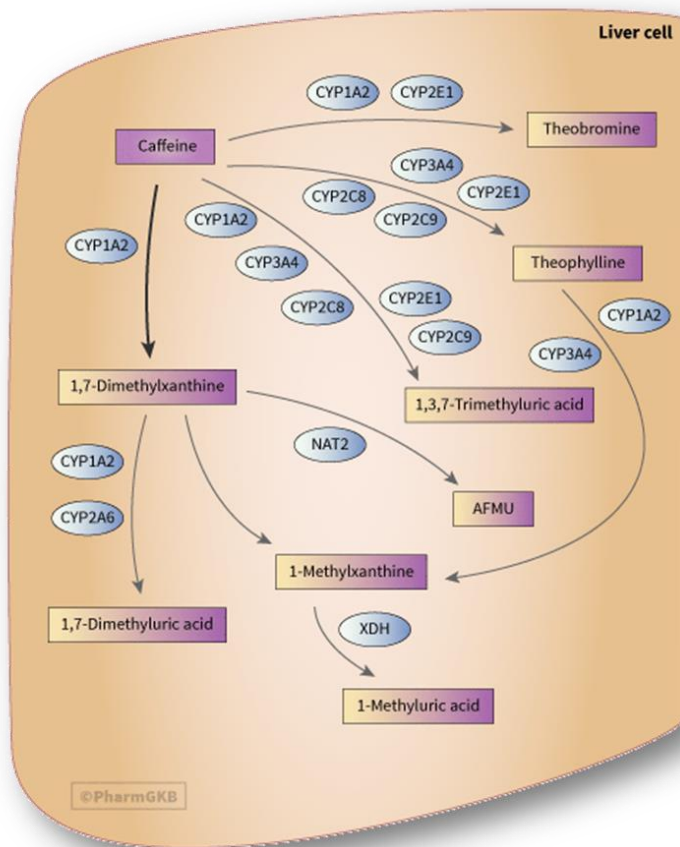
1.3.1 Μηχανισμός Δράσης της Καφεΐνης

Έχοντας ψυχοδιεγερτικές επιδράσεις, η καφεΐνη επιδρά στο ΚΝΣ με τρεις μηχανισμούς (Fiani et al. 2021). Οι περισσότερες από αυτές τις βιολογικές επιδράσεις της καφεΐνης πραγματοποιούνται μέσω του ανταγωνισμού της με τους υποτύπους A₁ και A_{2A} του υποδοχέα της αδενοσίνης (Higdon & Frei 2006). Επομένως, οι μεθυλοξανθίνες, συμπεριλαμβανομένης της καφεΐνης, επηρεάζουν αρνητικά τη δράση της αδενοσίνης. Πιο συγκεκριμένα, η αδενοσίνη μειώνει πρωτίστως τη συγκέντρωση νευροδιαβιβαστών [της σεροτονίνης, της ντοπαμίνης (DA), της ακετυλοχολίνης, της νορεπινεφρίνης και του γλουταμινικού οξέος]. Αντιθέτως, η καφεΐνη μπλοκάρει τους υποδοχείς της αδενοσίνης και, επομένως, δρα αυξάνοντας τη συγκέντρωση αυτών των νευροδιαβιβαστών στο ΚΝΣ (Meeusen et al. 2013).

1.3.2 Μεταβολισμός της Καφεΐνης

Απορρόφηση Καφεΐνης: Η απορρόφηση της καφεΐνης πραγματοποιείται στο έντερο, χωρίς αυτή να συσσωρεύεται στον οργανισμό (Finnegan 2003). Η από του στόματος χορήγηση της

καφεΐνης εμφανίζει άμεση και γρήγορη απορρόφηση, έχοντας μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα εντός των πρώτων 30 λεπτών (Camfield et al. 2014). Παράλληλα, υποστηρίζεται ότι μετά την κατάποση η καφεΐνη απορροφάται σε χρονικό διάστημα 45 λεπτών (Nawrot et al. 2003). Επιπλέον, η δράση της αρχίζει στην πρώτη ώρα και έχει διάρκεια μέχρι και 4 ώρες (Baker & Theologus 1972).



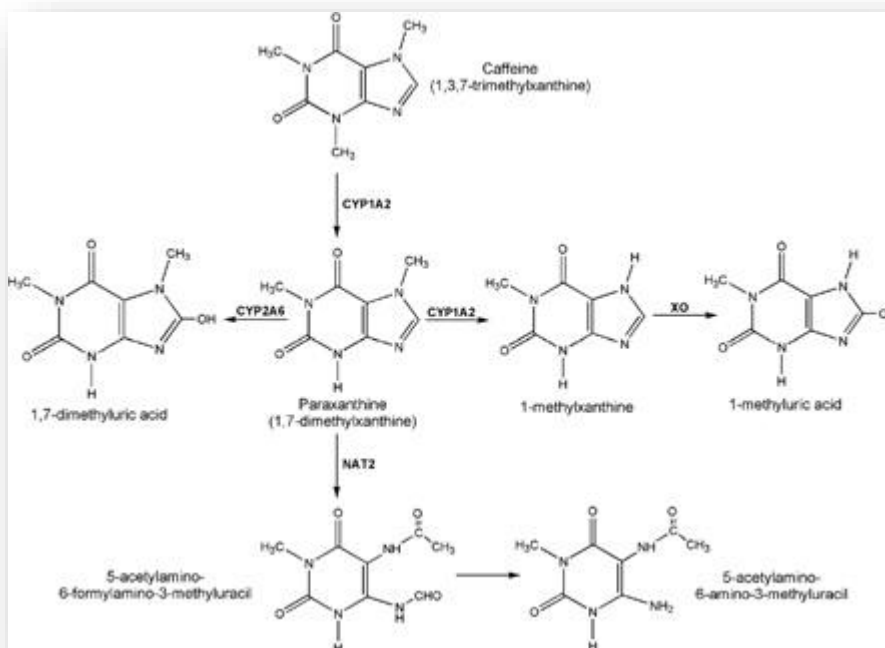
Εικόνα 1.6: Μεταβολικό Μονοπάτι Καφεΐνης <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165884757>

Ο μεταβολισμός της καφεΐνης στον άνθρωπο (Εικόνα 1.6) πραγματοποιείται στο ήπαρ σχεδόν εξολοκλήρου από το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 (ισομορφή CYP1A2), με κύριο προϊόν του μεταβολισμού την παραξανθίνη (1,7-διμεθυλοξανθίνη) και παραπροϊόντα τη θεοβρωμίνη και τη θεοφυλλίνη. Σημαντική ιδιότητα της καφεΐνης είναι ο έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας και ο μεταβολισμός μέσω του P450, της N-ακετυλοτρανσφεράσης 2 (NAT2) και της οξειδάσης/οξειδοαναγωγάσης της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO/ Xanthine Dehydrogenase, XDH) (Grzegorzewski et al. 2022). Ειδικότερα, η κύρια οδός οξείδωσης περιλαμβάνει την 3-διμεθυλίωση από το CYP1A2, με αποτέλεσμα η καφεΐνη να μετατρέπεται στην 1,7 διμεθυλοξανθίνη (παραξανθίνη/17X) (Higdon & Frei 2006). Επιπλέον, μέσω της 1-

διμεθυλίωσης, η 1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη οξειδώνεται σε θεοβρωμίνη από το ένζυμο CYP1A2 και από άλλες ισομορφές του P450 (Kot & Daniel 2008) (Εικόνα 1.7). Μια ακόμα μεταβολική οδός είναι μέσω της 7-διμεθυλίωσης, δηλαδή η μετατροπή της καφεΐνης σε θεοφυλλίνη από πολυάριθμες μορφές του P450 (Grzegorzewski et al. 2022).

Απέκκριση Καφεΐνης: Τελικό στάδιο του μεταβολισμού της καφεΐνης είναι η απέκκριση της στα ούρα με την μορφή των μεταβολιτών, ενώ ένα μικρό ποσοστό (3% και λιγότερο) απεκκρίνεται αμετάβλητο ως καφεΐνη και αποβάλλεται στα ούρα και στην χολή (Grzegorzewski et al. 2022, Rodak et al. 2021).

Γενετική ποικιλομορφία εμφανίζεται στον μεταβολισμό της καφεΐνης λόγω του πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) του γονιδίου CYP1A2 και του ADORA2A, του υποδοχέα A_{2A} της αδενοσίνης (Amin et al. 2012). Σχετικά με το γονίδιο CYP1A2 (rs762551), έχουν παρατηρηθεί διαφοροποιήσεις στον μεταβολισμό της καφεΐνης ανάμεσα σε άτομα με διαφορετικούς πολυμορφισμούς, λόγω τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Παράλληλα, σε ότι αφορά το γονίδιο ADORA2A εντοπίστηκε ένα SNP, το rs5751876, το οποίο επηρεάζει την απόκριση του οργανισμού στην καφεΐνη (Banks et al. 2019).



Εικόνα 1.7: Κύριες Μεταβολικοί Οδοί Καφεΐνης

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390500400009?cookieSet=1>

1.3.3 Θετικές Επιδράσεις

Περιορισμένα είναι τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ενέχονται κίνδυνοι από την πρόσληψη καφεΐνης, εφόσον αυτή βρίσκεται σε μέτριες, αποδεκτές ποσότητες, όπως αυτές έχουν οριστεί για τους ενήλικες (3-4 φλιτζάνια /ημέρα που παρέχουν 300-400 mg καφεΐνης/ημέρα). Αντιθέτως, εμφανίζονται και ορισμένες ενδείξεις που επιφέρουν οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (Higdon & Frei 2006).

Η καφεΐνη επιδρά θετικά σε εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως ο ύπνος, η νόηση, η μάθηση και η μνήμη. Επιπρόσθετα, ωφέλιμη είναι και η δράση της στο καρδιαγγειακό-μυϊκό σύστημα αυξάνοντας τη συστολική και διαστολική πίεση (Rogers et al. 2008), τους νεφρούς και το αναπνευστικό σύστημα (Δημούλα 2021). Σημαντική είναι η συνεισφορά της καφεΐνης και στην βελτίωση ορισμένων ασθενειών. Σύμφωνα με μία ανασκόπηση, η επίδραση της εμφανίζεται σε παθήσεις όπως η επιληψία, η κατάθλιψη και η σχιζοφρένεια (Ribeiro & Sebastião 2010). Η μέτρια κατανάλωση καφέ εμφανίζει οφέλη για την πρόληψη ορισμένων ασθενειών και την μείωση των ανεπιθύμητων συμπτωμάτων. Στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως είναι η νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease/AD) και η νόσος Πάρκινσον (Parkinson's disease/PD), η πρόσληψη καφεΐνης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισής τους και μετριάξει την εκδήλωση συμπτωμάτων, όπως τις διαταραχές ύπνου (Postuma et al. 2017). Ειδικότερα, στην επιδημιολογική μελέτη PEGASUS (Parkinson's Epidemiology and Genetic Associations Studies in the United States) συνδυάστηκαν δεδομένα DNA και παραγόντων κινδύνου από πέντε πληθυσμιακές μελέτες ελέγχου περιπτώσεων (case studies) και χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 1325 περιπτώσεις PD and 1735 υπό έλεγχο περιπτώσεις. Στην συγκεκριμένη μελέτη, φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός rs762551 και rs2470890 του γονιδίου CYP1A2 σε άτομα με γονότυπο CC συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης PD σε άτομα που καταναλώνουν καφέ (Popat et al. 2011). Παρόμοια είναι και η προστατευτική δράση στον σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), καθώς η καφεΐνη ελαττώνει την πιθανότητα εκδήλωσης παχυσαρκίας και μεταγενέστερα διαβήτη, αφού αυξάνει τη θερμογένεση και τον μεταβολισμό (Oba et al. 2010).

1.3.4 Αρνητικές Επιδράσεις

Η ευρεία κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν καφεΐνη αποτελεί αντικείμενο ανησυχίας για την επιστημονική κοινότητα και την ακεραιότητα της δημόσιας υγείας με τις πιθανές δυσμενείς

δράσεις που επιφέρει (Nawrot et al. 2003). Στις ΗΠΑ έχει παρατηρηθεί ότι το 90% των ενηλίκων λαμβάνει καφεΐνη σε μορφή καφέ, τσαγιού, ή από άλλα καφεϊνούχα τρόφιμα, ενώ πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι το 30% έως 50% των παιδιών και των εφήβων και το 80% των φοιτητών καταναλώνουν αρκετά συχνά ενεργειακά ποτά, που περιέχουν υψηλότερες ποσότητες καφεΐνης από ό,τι τα συμβατικά αναψυκτικά και προϊόντα καφέ, με αποτέλεσμα να εμφανιστούν αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες (Gurley et al. 2015). Τα τελευταία χρόνια, λοιπόν, αν και οι θανατηφόρες περιπτώσεις είναι αρκετά σπάνιες, τα περιστατικά δηλητηριάσεων από καφεΐνη φαίνεται να αυξάνονται, γεγονός που δικαιολογεί την πιο συχνή, ευρεία και πολλές φορές υπερβολική χρήση αναλγητικών, διεγερτικών φαρμάκων του ΚΝΣ, συμπληρωμάτων διατροφής, καθώς και την ανεξέλεγκτη κατανάλωση προϊόντων που εμπεριέχουν το συστατικό αυτό (Cappelletti et al. 2018). Ο πρώτος θάνατος μίας νεαρής κοπέλας που οφειλόταν σε θανατηφόρα δηλητηρίαση από καφεΐνη μετά από ενδοφλέβια χορήγηση καφεΐνης παρατηρήθηκε το 1959 (Dimaio & Garriott 1974). Ωστόσο, τα επιβλαβή χαρακτηριστικά υπερκατανάλωσης καφεΐνης αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1833 και μέχρι το 1980 οι πιθανές τοξικές επιδράσεις της αναφέρονταν σποραδικά στη βιβλιογραφία, μετά την κατανάλωσή της με άλλες νόμιμες ή παράνομες ουσίες (κοκαΐνη) (Gurley et al. 2015). Τα τελευταία 40 χρόνια από την άλλη, η σχέση και η αλληλεπίδραση του καφέ και της καφεΐνης με την υγεία και τις ασθένειες που μπορεί να σχετίζονται, έχει παρουσιαστεί και δημοσιευτεί σε περισσότερες από 8.000 ιατρικές μελέτες, με τα αποτελέσματα να είναι αντικρουόμενα. Σήμερα δεν είναι λίγα τα άτομα που εξακολουθούν να αποφεύγουν τον καφέ με καφεΐνη επειδή ανησυχούν για τις βιολογικές επιδράσεις της (Bae et al. 2014). Μάλιστα, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration/FDA) απαγόρευσε την κυκλοφορία κάποιων προϊόντων με καφεΐνη λόγω ανησυχιών σχετικά με την ανεκτικότητα της από το 2000 έως το 2004 (Gurley et al. 2015). Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι το 2016 αναφέρθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου Δηλητηριάσεων των ΗΠΑ 3702 εκθέσεις δηλητηρίασης από καφεΐνη, με ίση αναλογία περιπτώσεων παιδιών και ενηλίκων (Gummin et al. 2017).

1.3.5 Τοξικότητα της καφεΐνης

Ακόμη και σήμερα δεν έχει καθοριστεί ένα συγκεκριμένο απαράβατο όριο κατανάλωσης της καφεΐνης, όπως συμβαίνει σε αρκετά άλλα συστατικά και ουσίες, με την εκτίμηση της παραδοσιακής Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (Acceptable Daily Intake / ADI). Το γεγονός

αυτό οφείλεται στο ότι οι δράσεις της καφεΐνης διαφοροποιούνται μεταξύ των ατόμων, καθώς η ατομική ανοχή ποικίλει και εξαρτάται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες με ορισμένους ανθρώπους να μπορούν να καταναλώνουν μεγαλύτερα επίπεδα από άλλους. Οι συχνοί καταναλωτές, με την επαναλαμβανόμενη και τακτική πρόσληψη αναπτύσσουν ανοχή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καφεΐνης σε σχέση με άλλους χρήστες, που βιώνουν τις ίδιες φυσιολογικές επιδράσεις της ένωσης σε χαμηλότερα επίπεδα πρόσληψης (Turnbull et al. 2016). Επιπλέον, η ευαισθησία του κάθε οργανισμού μεταβάλλεται από διάφορους γενετικούς πολυμορφισμούς που επηρεάζουν τον μεταβολισμό της καφεΐνης, όπως αποδείχτηκε και σε μια έρευνα σχετικά με τους γενετικούς πολυμορφισμούς στην απολιποπρωτεΐνη E (APOE) (Bae et al. 2014). Παρ' όλα αυτά, αρκετοί οργανισμοί, όπως ο FDA, ο Οργανισμός Υγείας του Καναδά και η EFSA έχουν δημοσιεύσει ότι πρόσληψη 400 mg καφεΐνης είναι σπάνιο να αποτελεί κίνδυνο σοβαρής βλάβης για τον γενικό πληθυσμό των ενηλίκων (Willson 2018). Από την άλλη πλευρά, δόσεις που φτάνουν τα 500 mg και ξεπερνούν τα 600-800 mg/ημέρα θεωρούνται επί το πλείστον επικίνδυνες για τον οργανισμό και μπορούν να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα αλλά και χρόνια τοξικότητα, μία κατάσταση που αποκαλείται καφεϊνισμός (συνήθως εμφανίζεται με ημερήσιες προσλήψεις 1 έως 1,5 g την ημέρα) (Smith 2002).

1.3.6. Κλινικές επιπλοκές της καφεΐνης

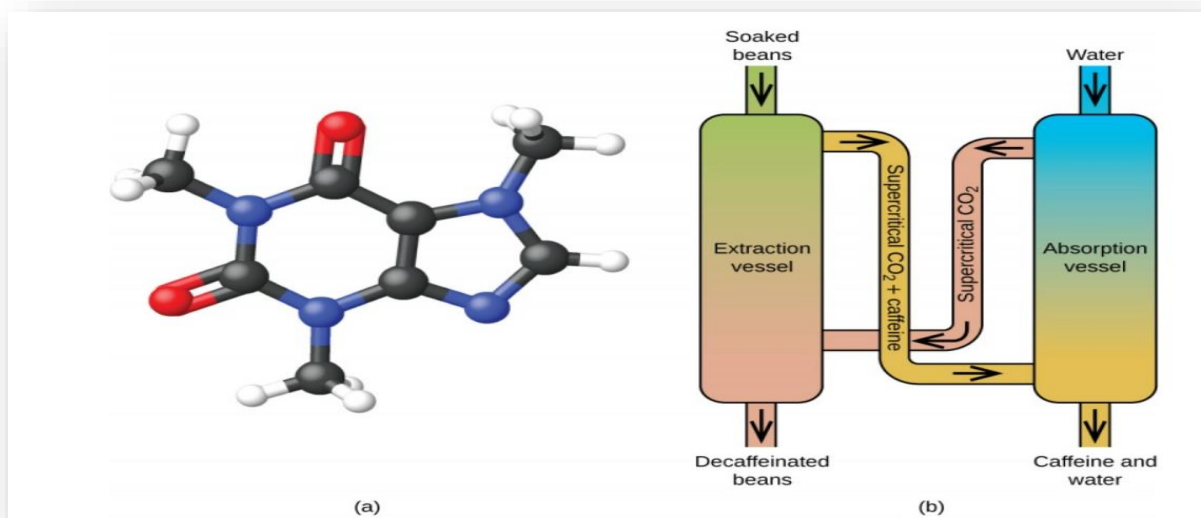
Τα κλινικά χαρακτηριστικά διάγνωσης της δηλητηρίασης εμφανίζουν ποικιλομορφία και επηρεάζουν αρκετές και διαφορετικές παθοφυσιολογικές λειτουργίες. Εμφανίζονται καρδιαγγειακά συμπτώματα (υπέρταση, υπόταση, ταχυκαρδία, βραδυκαρδία, ισχαιμία και έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιακή ανακοπή και κοιλιακή μαρμαρυγή που προσδιορίζεται ως η συχνότερη αιτία θανάτου), γαστρεντερικά συμπτώματα (ναυτία, έμετος, κοιλιακό άλγος, διάρροια), ψυχολογικά και νευρολογικά συμπτώματα (παραισθήσεις, ψευδαισθήσεις, τρόμος, άγχος, επιληπτικές κρίσεις, κώμα), μεταβολικά συμπτώματα (υποκαλιαιμία, υπονατριαιμία, υπασβεστιαίμία, μεταβολική οξέωση, αναπνευστική αλκάλωση, υπεργλυκαιμία, πυρετός), μυοσκελετικά συμπτώματα (αδυναμία, ακαμψία, τρόμος, ραβδομυόλυση), πνευμονικά συμπτώματα (υπεραερισμός, αναπνευστική ανεπάρκεια), ζάλη, διούρηση και, τέλος, θάνατος (Willson 2018). Δεν υπάρχει κάποια τυποποιημένη μέθοδος θεραπείας και αντιμετώπισης, αν και έχουν χορηγηθεί με επιτυχία στο παρελθόν ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, διττανθρακικό νάτριο και αιμοκάθαρση σε περιπτώσεις τοξικότητας (Campana et al. 2014).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι χρήστες πρέπει να αποφύγουν την απότομη διακοπή της χορήγησής της, καθώς θα εμφανιστούν συμπτώματα στέρησης 12 έως 24 ώρες από την τελευταία κατανάλωση, τα οποία τείνουν να κορυφώνονται σε μία έως δύο ημέρες, επιμένοντας έως και μία εβδομάδα (Evans et al. 2022). Στη συνέχεια ο κίνδυνος εμφάνισης υπερβολικής συγκέντρωσης καφεΐνης στον ορό του αίματος (άνω των 80 mg) είναι πιθανότερο να προκληθεί από την κατάποση φαρμάκων και συμπληρωμάτων που περιέχουν καφεΐνη και όχι καφεϊνούχων τροφίμων ή ποτών (Bae et al. 2014) (Cappelletti et al. 2018). Έχει υποστηριχθεί μάλιστα ότι τα προβλήματα ανεκτικότητας σχετίζονται με την επίδραση της καφεΐνης στις συμπαθομιμητικές αμίνες, ενώ οι φαρμακολογικές και τοξικολογικές δραστηριότητές της επηρεάζονται από άλλες φυτοχημικές ουσίες που υπάρχουν στα σκευάσματα των συμπληρωμάτων (Gurley et al. 2015). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση αφιλτράριστου καφέ έχει συσχετιστεί με υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικής και λιποπρωτεϊνικής χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης στον ορό, ενώ σύμφωνα με μελέτες φαίνεται να προσελκύει σε μεγάλο βαθμό το κάπνισμα, δημιουργώντας μια δυνατή αλληλεξαρτωμένη σχέση με αυτό (Bae et al. 2014). Αναφέρεται ότι ο καπνός του τσιγάρου αυξάνει τον μεταβολισμό της καφεΐνης (Bjorngaard et al. 2017). Υπάρχουν ακόμα αντενδείξεις για την καφεΐνη για κάποιες ομάδες ατόμων, τα οποία παρουσιάζουν σοβαρό άγχος, καρδιαγγειακή νόσο, πεπτικό έλκος ή γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, ηπατική ή νεφρική δυσλειτουργία, επιληπτικές κρίσεις και εγκυμοσύνη (Το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων θεωρεί τα 200 mg ημερησίως ασφαλή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης) (Evans et al. 2022). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η καφεΐνη προκαλεί αϋπνία, ενώ διερευνάται ο ρόλος που παίζει τόσο στις διατροφικές όσο και στις αγχώδεις διαταραχές και κρίσεις πανικού (Winston et al. 2005).

1.3.7 Καφές χωρίς καφεΐνη

Ο καφές χωρίς καφεΐνη (ντεκαφεϊνέ) αποτελεί στις μέρες μας μία πολύ συχνή επιλογή ροφήματος. Το χαρακτηριστικό που τον διαχωρίζει με τον «κλασικό» καφέ είναι η ποσότητα και η συγκέντρωση καφεΐνης που περιέχει, ενώ πολλές από τις άλλες θρεπτικές ουσίες δεν φαίνεται να διαφέρουν. Αναφέρεται ότι ο καφές χωρίς καφεΐνη δεν συσχετίζεται θετικά με τη γνωστική επίδοση, όπως ο κανονικός καφές (Dong et al. 2020). Από την άλλη πλευρά, υποστηρίζεται ότι η κατανάλωση καφέ με καφεΐνη και χωρίς καφεΐνη μειώνει εξίσου το ίδιο τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2, παρέχοντας το ίδιο επίπεδο προστασίας (Nieber

2017). Σίγουρα, λοιπόν, διαπιστώνεται ότι η απομάκρυνση της καφεΐνης ακολουθείται από θετικές και από αρνητικές επιδράσεις στα άτομα που την προτιμούν, με αρκετές απόψεις να αμφιταλαντεύονται. Η τεχνική απομάκρυνσής της συμβαίνει με μια διαδικασία που ονομάζεται αποκαφεΐνοποίηση (Εικόνα 1.8). Οι πρώτες τεχνικές χρησιμοποίησαν οργανικούς διαλύτες με στόχο την απομάκρυνση της καφεΐνης από τον κόκκο του καφέ. Όμως, όπως αποδείχτηκε, τα οργανικά αυτά κατάλοιπα φάνηκαν να είναι περισσότερο επιβλαβή από την ίδια την καφεΐνη. Σήμερα, η συγκεκριμένη διαδικασία παραμένει αρκετά δαπανηρή, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις απομακρύνονται μεταξύ άλλων και κάποιες ενώσεις στις οποίες οφείλονται η αυθεντική γεύση και το άρωμα του καφέ. Συχνά υλοποιείται υπερκρίσιμη εκχύλιση που περιλαμβάνει πλύσιμο των κόκκων με υγρό διοξείδιο του άνθρακα. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με την συμβολή της μοριακής βιολογίας έχουν γίνει προσπάθειες κατασκευής διαγονιδιακών φυτών και κόκκου καφέ με μειωμένη περιεκτικότητα σε καφεΐνη, με τη χρήση τεχνικών παρέμβασης RNA (Jameel 2003).

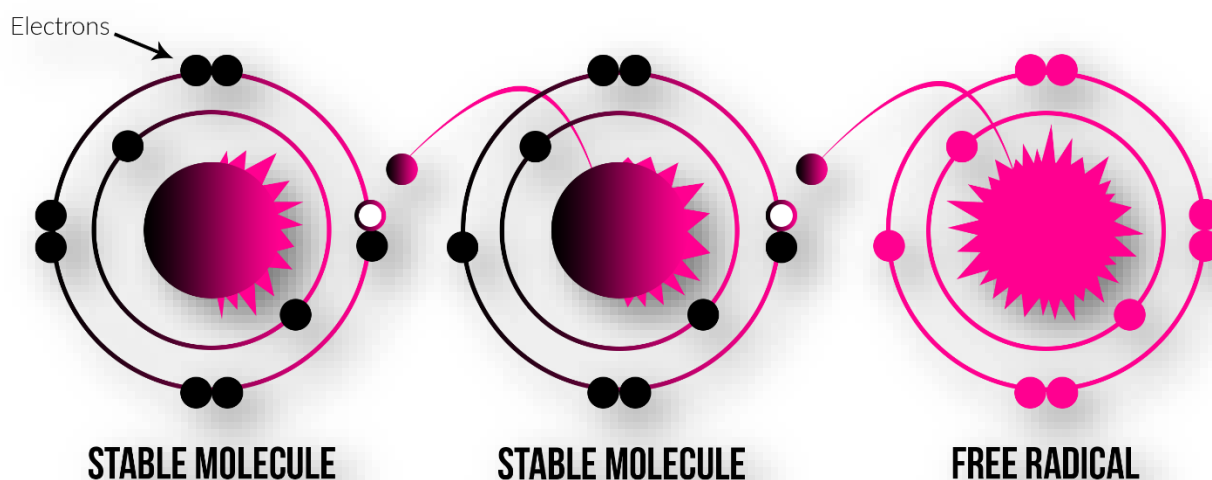


Εικόνα 1.8: (α) Τα μόρια της καφεΐνης έχουν τόσο πολικές όσο και μη πολικές περιοχές, γεγονός που την καθιστά διαλυτή σε διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. (β) Το σχήμα δείχνει μια τυπική διεργασία αποκαφεΐνοποίησης που περιλαμβάνει υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. [Decaffeinating Coffee Using Supercritical CO₂ | Liquids and Solids \(nigerianscholars.com\)](https://nigerianscholars.com/Decaffeinating-Coffee-Using-Supercritical-CO2-Liquids-and-Solids)

1.4 Ελεύθερες Ρίζες

1.4.1 Ρόλος Ελεύθερων Ριζών

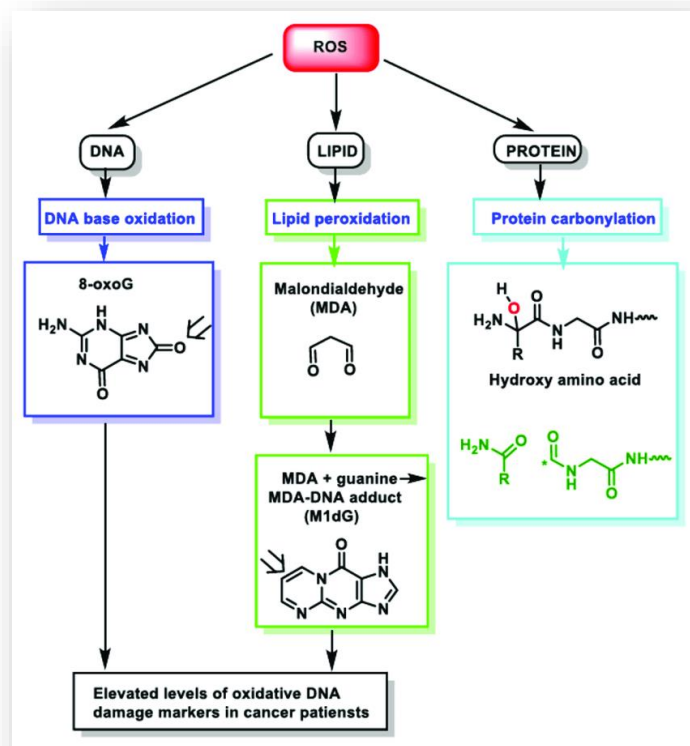
Τα ηλεκτρόνια κατέχουν συγκεκριμένες θέσεις σε ένα άτομο, με τη μορφή διαφορετικών ζευγών ηλεκτρονίων, που ονομάζονται τροχιακά. Οι ελεύθερες ρίζες (free radicals) ορίζονται ως άτομα, μόρια ή ιόντα που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα, έχοντας την ικανότητα αυτόνομης ύπαρξης. Ασύζευκτο ονομάζεται ένα ηλεκτρόνιο που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό (Halliwell & Gutteridge 2015). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ισχυρή τάση να αποσπούν ηλεκτρόνια, δηλαδή να ανάγονται, από άλλα μόρια με την μεγαλύτερη εγγύτητα προκειμένου να αποκτήσουν μια σταθερή δομή, μέσα από την συμπλήρωση της εξωτερικής τους στιβάδας (Τσατσάκης 2022) (Εικόνα 1.9). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ιδιαίτερα ασταθείς, δραστικές ενώσεις, με μικρή διάρκεια ζωής (Veskoukis et al. 2012).



Εικόνα 1.9: Διαφοροποίηση μεταξύ χημικής δομής ενός σταθερού μορίου και μιας ελεύθερης ρίζας <https://blondevibe.com/freeradicals/>

Παρά τις αντιπαράθεσεις σχετικά με την επιβλαβή δράση των ελευθέρων ριζών, ο ρόλος τους αποδεικνύεται ότι είναι διττός. Αυτό συμβαίνει διότι οι ελεύθερες ρίζες υπακούν στο φαινόμενο της όρμησης (Τσατσάκης 2022). Ειδικότερα για το φαινόμενο της όρμησης όταν τα μόρια των ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στις υποκυτταρικές διεργασίες, αποτελώντας σηματοδοτικά μόρια απαραίτητα για τη ρύθμιση των βιολογικών διεργασιών (π.χ. κυτταρική σηματοδότηση). Από την άλλη μεριά, αν οι ελεύθερες ρίζες είναι παρούσες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα όρια, μπορεί να έχουν

βλαβερές επιπτώσεις, προσβάλλοντας κυτταρικά συστατικά όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, τροποποιώντας έτσι τις λειτουργίες τους (Εικόνα 1.10) (Veskoukis et al. 2012). Επομένως, σε ένα κυτταρικό περιβάλλον, απαραίτητη κρίνεται η ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μορίων και όταν αυτή δεν υπάρχει, ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Lobo et al. 2010). Η έννοια αυτή αναφέρεται σε αυτήν την ανισορροπία, μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, με υπέρμετρη παραγωγή των πρώτων που διαταράσσει την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Τσατσάκης 2022). Αιτίες πρόκλησης οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε η μειωμένη ικανότητα άμυνας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Πλέον, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με ορισμένες ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Liguori et al. 2018).



Εικόνα 1.10: Επιπτώσεις από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών σε κυτταρικά συστατικά https://www.researchgate.net/figure/ROS-action-on-DNA-lipids-and-proteins-lead-to-DNA-base-oxidation-lipid-peroxidation-and_fig3_351125215

Για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, έχουν προσδιοριστεί διάφορες κατηγορίες βιοδεικτών οξειδοαναγωγής (Veskoukis et al. 2019). Ως βιοδείκτης, έχει οριστεί ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και αξιολογείται ως δείκτης βιολογικών, παθολογικών διεργασιών ή φαρμακευτικών αποκρίσεων και είναι ικανός να

προβλέψει κάποια ενδιάμεση ή τελική έκβαση κλινικών περιπτώσεων (Biomarkers Definitions Working Group, 2001) (Skwarski & Higgins 2016).

1.4.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια που ανήκουν στην κατηγορία των δραστικών μορφών (Harman 1956). Πιο συγκεκριμένα, οι καλύτερα μελετημένες δραστικές μορφές είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στις οποίες ανήκουν τόσο ελεύθερες ρίζες όσο και μη ρίζες [όπως το H_2O_2 (hydrogen peroxide/υπεροξειδίο του υδρογόνου)] (Εικόνα 1.11). Οι ROS είναι τα μόρια, ιόντα ή άτομα που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με την αναγωγή ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων, έχοντας ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο (Παπαγεωργίου 2009). Σημαντικό είναι ότι οι δύο αυτές έννοιες δεν ταυτίζονται, καθώς μπορεί όλες οι ελεύθερες ρίζες να είναι δραστικές μορφές, αλλά όλες οι δραστικές μορφές δεν είναι ελεύθερες ρίζες (Τσατσάκης 2022). Εκτός από τις ROS υπάρχουν και άλλες κατηγορίες, ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο, που διακρίνονται στις δραστικές μορφές αζώτου (RNS, Reactive Nitrogen Species), στις δραστικές μορφές θείου (RSS) και στις δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) (Halliwell & Gutteridge 2015).

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	Σύμβολο	Χρόνος ημιζωής	Χαρακτηριστικά
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	$OH^{\bullet}$	10^{-9} s	Εξαιρετικά δραστική ρίζα Διαχέεται διαμέσου των μεμβρανών
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	1O_2	10^{-6} s	Ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται στις βιολογικές αντιδράσεις
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6} s	Μη ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται στα μιτοχόνδρια
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxyl Radical)	$RO^{\bullet}$	10^{-6} s	Ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται κατά την οξείδωση λιπιδίων
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxyl Radical)	$ROO^{\bullet}$	10^{-2} s	Μη ισχυρό οξειδωτικό Παράγεται κατά την οξείδωση λιπιδίων
Όζον (Ozone)	O_3	s	Βρίσκεται στην ατμόσφαιρα Παράγει 1O_2
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H_2O_2	min	Σταθερή ROS, Σηματοδοτικό μόριο Οδηγεί στην παραγωγή $OH^{\bullet}$
Υδροϋπεροξειδίο (Hydroperoxide)	$ROOH$	Σταθερό	Αντιδρά με μέταλλα και παράγει ελεύθερες ρίζες

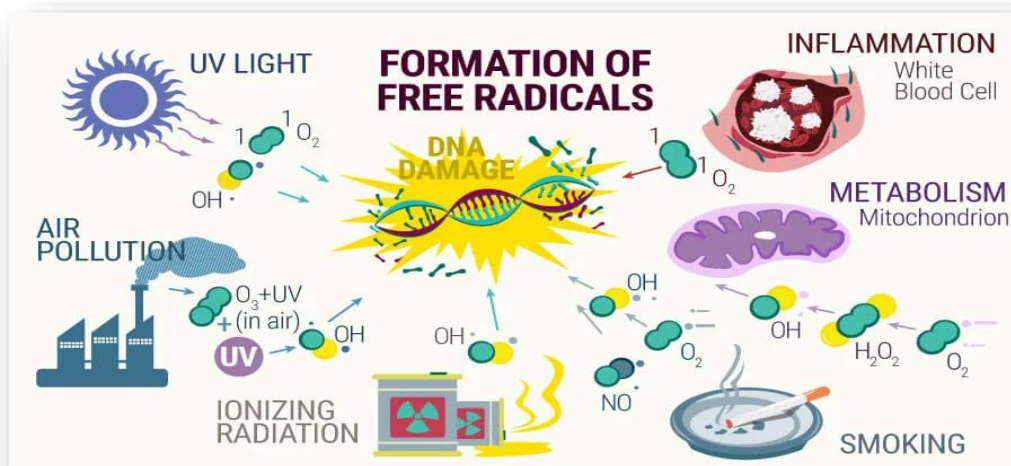
Εικόνα 1.11: Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου και τα χαρακτηριστικά τους.

1.4.3 Σχηματισμός και παραγωγή Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται είτε ενδοκυτταρικά είτε εξωκυτταρικά, κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.12. Ο σχηματισμός τους πραγματοποιείται με τρεις μηχανισμούς και συγκεκριμένα μέσω ομολυτικής διάσπασης του ομοιοπολικού δεσμού ενός μορίου, μέσω της απώλειας ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή της προσθήκης ηλεκτρονίου σε ένα μόριο (Sharma et al. 2018). Πιο συγκεκριμένα, ο ομοιοπολικός δεσμός είναι ο χημικός δεσμός που σχηματίζεται με αμοιβαία συνεισφορά ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων που περιστρέφονται με αντίθετα spin ($\uparrow\downarrow$) και η διάσπασή του μπορεί να είναι είτε ομολυτική είτε ετερολυτική (Southorn & Powis 1988). Ομολυτική, ονομάζεται η συμμετρική διάσπαση του δεσμού όπου τα δύο θραύσματα διατηρούν το καθένα ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζουν δύο ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, στην ετερολυτική πραγματοποιείται σχάση του δεσμού και προϊόντα της αντίδρασης είναι ένα ανιόν και ένα κατιόν (Γάλαρης 2015).

Η ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά με ενζυμικό τρόπο ή και απουσία ενζύμων, όπως είναι οι αντιδράσεις ιονισμού. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από τις κυριότερες ενδοκυτταρικές πηγές, που είναι τα μιτοχόνδρια ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η φαγοκυττάρωση λόγω φλεγμονής (Lobo et al. 2010). Συμπληρωματικά, άλλα σημεία παραγωγής τόσο των ελευθέρων ριζών όσο και των ROS είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπεροξειδισώματα με τη συμμετοχή της οξειδάσης της ξανθίνης και η αυτοοξειδωση μικρών μορίων (Sarniak et al. 2016).

Οι εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών και ROS είναι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ο καπνός του τσιγάρου, τόσο σε ενεργητικό όσο και σε παθητικό κάπνισμα, η έκθεση στο όζον με την τελική υπεροξειδωση των λιπιδίων, τα ιόντα βαρέων μετάλλων (με κυριότερο μηχανισμό την αντίδραση Fenton) όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, ο υδράργυρος, η διατροφή και η ιονίζουσα ακτινοβολία, είτε με την έκθεση σε υπεριώδες φως είτε σε ακτίνες X (Birben et al. 2012). Επιπλέον, σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν οι βιομηχανικοί διαλύτες και οι περιβαλλοντικοί ρύποι (Lobo et al. 2010).

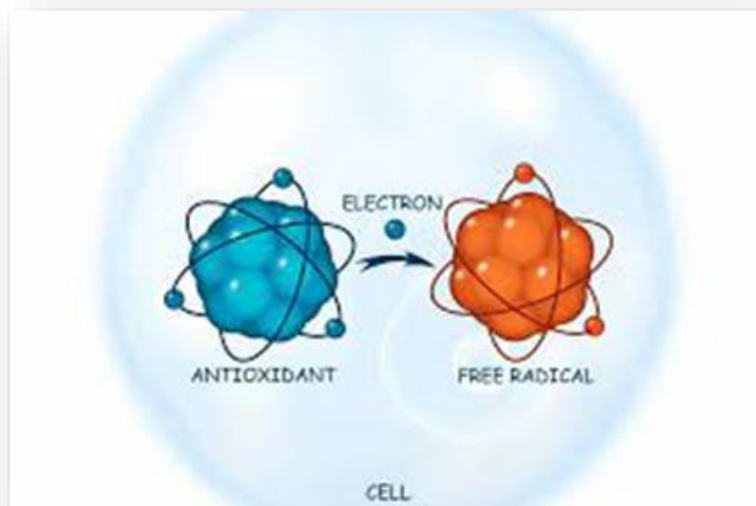


Εικόνα 1.12: Ενδογενείς (μεταβολισμός, φλεγμονή) και εξωγενείς (κάπνισμα, ιονίζουσα ακτινοβολία, ατμοσφαιρική ρύπανση, υπεριώδης ακτινοβολία) παράγοντες δημιουργίας ελεύθερων ριζών <https://andrologylab.gr/en/services/control-of-oxidative-stress/>

1.5 Αντιοξειδωτικά

1.5.1 Ένζυμα και μη ενζυμικοί μεταβολίτες

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιαδήποτε ουσία έχει την ικανότητα να επιβραδύνει, να εμποδίζει ή να αφαιρεί την οξειδωτική βλάβη ενός υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge 2015) (Εικόνα 1.13). Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν πολλά ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά που δρουν έναντι των ROS και άλλων οξειδωτικών (Birben et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, ενώ τα εξωγενή προσλαμβάνονται αποκλειστικά μέσω διατροφής (Lobo et al. 2010). Παράλληλα, τα αντιοξειδωτικά μόρια εντοπίζονται τόσο στο ενδοκυτταρικό όσο και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η δράση τους βασίζεται κυρίως στην καταστολή του σχηματισμού των ελευθέρων ριζών, εφόσον τα αντιοξειδωτικά είναι αρκετά σταθερά μόρια, που δίνουν ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντάς την (Jeeva et al. 2015).



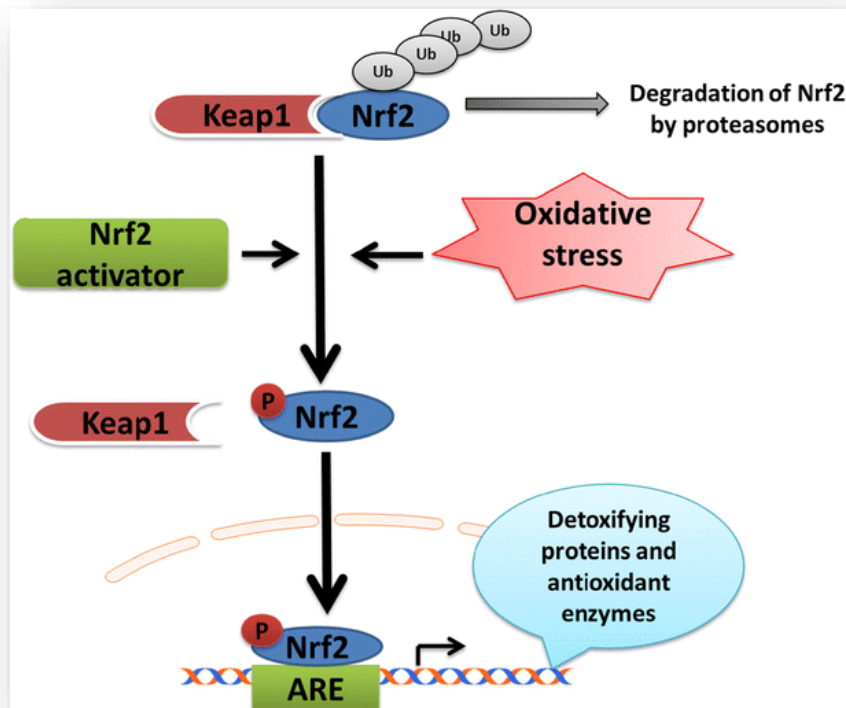
Εικόνα 1.13: Δράση των αντιοξειδωτικών στην καταστολή των ελευθέρων ριζών <https://nabtahealth.com/articles/how-free-radicals-affect-the-skin/>

Στα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν η υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), η καταλάση (catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR) (Jeeva et al. 2015). Άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η περοξυρεδοξίνη (Peroxiredoxin, Prx), οι θειορεδοξίνες (Thioredoxins, TRXs), οι γλουταρεδοξίνες (Glutaredoxins, Grx) και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-Transferase, GST) (Birben et al. 2012). Αντίθετα, οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μεταβολίτες, που πολλοί από αυτούς δεν μπορούν να παραχθούν από τον οργανισμό και λαμβάνονται μέσω διατροφής, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: λιπόφιλους, υδρόφιλους και εξωγενείς. Οι λιπόφιλοι μεταβολίτες, επομένως, είναι η α-τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε), τα καροτενοειδή (Β-καροτένιο), η ουμπικινόνη (συνένζυμο Q) και η μελατονίνη, ενώ υδρόφιλοι θεωρούνται το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), η γλουταθειόνη (GSH), το ουρικό οξύ, η τρανσφερίνη, η απτοσφαιρίνη (HP) και η κερουλοπλασμίνη. Επιπλέον, στα εξωγενή μόρια ανήκουν οι πολυφαινόλες (Sharma et al. 2018).

1.5.2 Μοριακός Μηχανισμός Nrf-2

Ένας μηχανισμός ενεργοποίησης των γονιδίων, που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικούς και αποτοξινωτικούς μεταβολίτες, είναι αυτός του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 (nuclear factor erythroid-2 related factor-2) (Zhang et al. 2015). Πρόκειται για έναν ρυθμιστικό παράγοντα

έκφρασης πολλών αντιοξειδωτικών γονιδίων και ρυθμιστή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και σηματοδότησης (Oh & Jun 2017). Φυσιολογικά, ο Nrf-2, είναι συνδεδεμένος στο κυτταρόπλασμα με τον ενδογενή αναστολέα Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1), μια πρωτεΐνη που μεσολαβεί στην αποικοδόμηση του Nrf-2 από το πρωτεόσωμα (Zhang et al. 2015). Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, χημικοί επαγωγείς που αντιδρούν με θειόλη συνδέονται ομοιοπολικά με κάποιο από τα 27 κατάλοιπα της Keap1, έπειτα ο Nrf2 σταθεροποιείται, αποδεσμεύεται από αυτή, φωσφορυλιώνεται και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου (Zhang & Hannink 2003) (Εικόνα 1.14). Σε συνέχεια αυτού του μοριακού μηχανισμού, ο Nrf-2 προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες ARE (antioxidant response elements, στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Wakabayashi et al. 2004).



Εικόνα 1.14: Σχηματικό διάγραμμα του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf-2 και Keap1

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11154-014-9305-9>

1.6 Αίμα

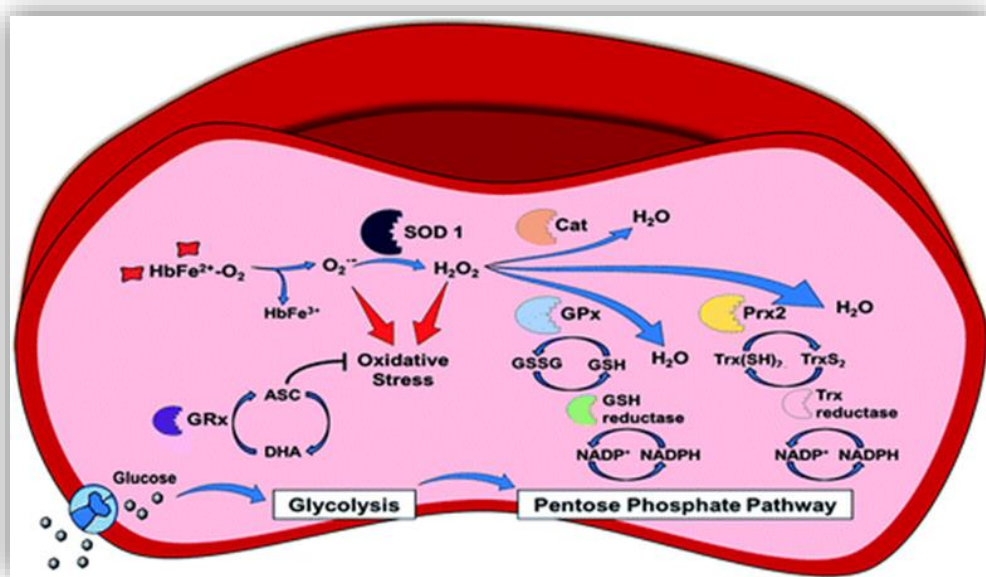
1.6.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Το αίμα συνιστά ένα υγρό όργανο ή αλλιώς ιστό, το οποίο διαδραματίζει μέγιστης σημασίας ρόλο στην ύπαρξη αλλά και επιβίωση του ανθρώπινου οργανισμού. Η μεταφορά θρεπτικών συστατικών, ηλεκτρολυτών, ορμονών, βιταμινών και οξυγόνου, η απομάκρυνση παραπροϊόντων του μεταβολισμού, η διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος και η επούλωση πληγών αποτελούν μόνο μερικές από τις κύριες λειτουργίες του (Schaller et al. 2008). Αξίζει να αναφερθεί ότι στο σώμα ενός μέσου ενήλικα κυκλοφορούν πέντε λίτρα αίματος (Τσουμάνης 2014). Οι ιδιαίτερες και απαραίτητες ιδιότητές του είχαν ήδη αναγνωριστεί στην αρχαία Ελλάδα, με τον Ιπποκράτη να υποστηρίζει ότι οι ασθένειες προκύπτουν από μία φυσικής αιτίας ανισορροπία των τεσσάρων χυμών (δηλαδή του αίματος, του φλέγματος, της κίτρινης χολής και της μαύρης χολής) και δεν οφείλονται σε κάποια «θεϊκή παρέμβαση» (Anderson & Anderson 2002). Ακόμα οι πρώτες επιτυχείς μεταγγίσεις αίματος από φλέβα σε φλέβα πραγματοποιήθηκαν για πρώτη φορά τον 19^ο αιώνα, ενώ ο Καρλ Λαντστάινερ τον 20^ο αιώνα βραβεύτηκε με Νόμπελ για την περιγραφή τόσο των ουσιών των ομάδων αίματος όσο και του συστήματος ομάδων ABO (Schaller et al. 2008). Συγκεκριμένα, λοιπόν, το αίμα είναι ένα πολύ σύνθετο μείγμα συστατικών και κατά κύριο λόγο μπορεί να διαχωριστεί σε δύο μέρη, στο πλάσμα (55% του αίματος) και στα διάφορα έμμορφα κύτταρά του (45% του αίματος). Ειδικότερα, στα έμμορφα συστατικά του ανήκουν τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια.

1.6.2 Ερυθροκύτταρα και αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Για πολλά χρόνια υποστηριζόταν ότι ο μοναδικός ρόλος των ερυθροκυττάρων είναι η μεταφορά οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα, θρεπτικών και άχρηστων συστατικών μεταξύ των διάφορων ιστών του σώματος, καθώς και η διατήρηση της ισορροπίας του pH. Πρόσφατες μελέτες φανέρωσαν, ωστόσο, νέες σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του οργανισμού (Εικόνα 1.15). Πλέον, είναι γνωστό ότι τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν ισχυρούς ενζυμικούς και μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης (GSH), βιταμίνης C και E, ανηγμένων ισοδυνάμων [NADH και NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate / φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο)] και αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση (CAT) (Kuhn et al. 2017). Στη συνέχεια τα ερυθροκύτταρα αποτελούν συχνά αντικείμενο μελέτης σχετικά με την ομοιόσταση των κυττάρων, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική βλάβη, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες τους, στις υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και της αιμοσφαιρίνης (Grebowski et al. 2022). Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι η αιμόλυση, δηλαδή η διαταραχή της ομοιόστασης των ερυθροκυττάρων, έχει συσχετιστεί με διάφορες σοβαρές παθολογικές καταστάσεις (Kuhn et al. 2017).



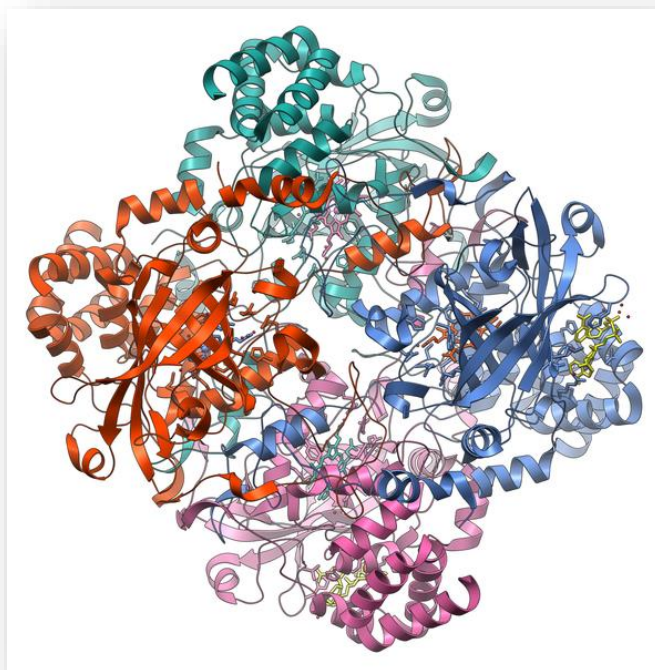
Εικόνα 1.15: Ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στα ερυθρά αιμοσφαίρια <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>

1.7 Καταλάση

1.7.1 Γενικά Χαρακτηριστικά της Καταλάσης

Οι καταλάσες (Catalases, CAT) είναι σημαντικά υπεροξειδιοσωμικά ένζυμα, των οποίων η ιστορία ξεκινά και χρονολογείται από τον 19^ο αιώνα. Αποτέλεσαν μία από τις πρώτες πηγές πολύτιμων πληροφοριών για την λειτουργία, φύση και συμπεριφορά των ενζύμων. Ο Thenard (1811), που ανακάλυψε το H₂O₂, υποστήριξε ότι η αποικοδόμησή του στους ζωντανούς ιστούς πραγματοποιείται από μια ειδική ουσία και ο Loew (1901) ήταν ο πρώτος που ονόμασε αυτή την ουσία καταλάση, λόγω της εμφανιζόμενης καταλυτικής της δράσης (Zámocký & Koller 1999). Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου της ανθρώπινης καταλάσης έγιναν το

1986 (Quan et al. 1986). Συγκεκριμένα, η χαρτογράφηση του γονιδίου της ανθρώπινης καταλάσης έχει πραγματοποιηθεί στο 11ο χρωμόσωμα, στην ζώνη p13 και χωρίζεται σε 13 εξώνια και 12 ιντρόνια. Πολυμορφισμοί του γονιδίου εντοπίζονται στον υποκινητή, αντίστοιχα στα εξώνια και στα ιντρόνια καθώς και στις αμετάφραστες περιοχές του (Quan et al. 1986). Το ένζυμο αυτό συναντάται σε όλους τους αερόβιους μηχανισμούς. Πρόκειται για μία τετραμερή πρωτεΐνη που έχει μοριακό βάρος 244 kDa, εμφανίζει μοριακή συμμετρία και αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες. Κάθε μία υπομονάδα περιέχει 527 αμινοξέα, μια ομάδα αίμης στην ενεργή περιοχή της και ένα στενά συνδεδεμένο μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου και εμφανίζει μια αναμενόμενη συγκέντρωση 6,6 έως 13,7 μM . Έχει βρεθεί ότι το NADPH προστατεύει την CAT από την αδρανοποίηση από το H_2O_2 (Kodydková et al. 2014). (Εικόνα 1.16)



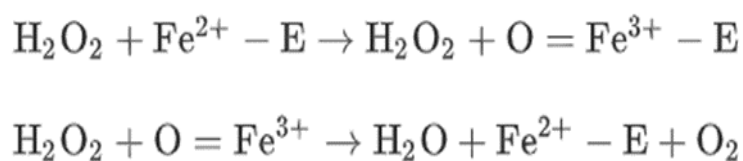
Εικόνα 1.16: Τετραμερής Δομή της CAT [PDB 7cat EBI - Catalase - Wikipedia](#)

1.7.2 Ο μηχανισμός της καταλάσης και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2

Το H_2O_2 είναι ένας σημαντικός "δεύτερος αγγελιοφόρος" και μόριο σηματοδότησης σε κυτταρικό επίπεδο, ενώ αποτελεί επιβλαβές υποπροϊόν που προκύπτει από τις διάφορες μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών. Μία από τις κύριες πηγές του είναι οι οξειδάσες

NADPH (NOX) που παράγουν κυρίως υπεροξείδιο, το οποίο αποσυντίθεται ταχέως σε H₂O₂ από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου. Είναι γνωστός ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίσει το H₂O₂ σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες (Kodydková et al. 2014). Παρόλα αυτά σε υψηλή συγκέντρωση είναι ιδιαίτερα τοξικό προκαλώντας προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και δημιουργώντας ρίζες υδροξυλίου (Martins & English 2014). Προκειμένου η βλαβερή του δράση να περιοριστεί θα πρέπει να μετατραπεί σε λιγότερο τοξικές μορφές.

Όλοι οι οργανισμοί που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο περιέχουν καταλάσες και αυτές είναι που διαθέτουν καταλυτική δραστηριότητα και μπορούν να διασπών αποτελεσματικά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και διοξυγόνο. Αυτό το επιτυγχάνουν χωρίς να καταναλώνουν πρόσθετα υποστρώματα-δότες ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα το ενδοκυτταρικό αναγωγικό περιβάλλον να διατηρείται (Martins & English 2014). Αυτό συμβαίνει γιατί η καταλάση είναι ειδική για το H₂O₂ και δεν διασπά τα οργανικά υπεροξείδια. Γνωρίζουμε βέβαια ότι αν και η καταλάση μπορεί να είναι το βασικό ένζυμο για την απομάκρυνση υψηλών ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων H₂O₂ στα υπεροξισώματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να συμβάλλουν και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPX) και οι υπεροξυρεδοξίνες για την αποικοδόμησή του (Kodydková et al. 2014). Οι λεπτομέρειες του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου παραμένουν ακόμη ασαφείς. Ωστόσο, ο πιο ευρέως αποδεκτός μηχανισμός αντίδρασης είναι αυτός που προτάθηκε από τους Deisseroth και Dounce (1970) (Veskoukis et al. 2018) (Εικόνα 1.17).

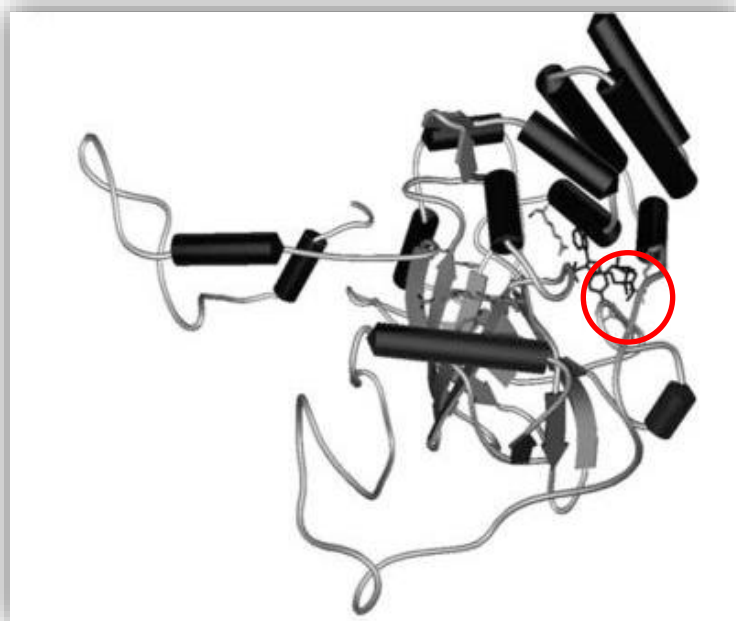


Εικόνα 1.17: Αντίδραση διάσπασης H₂O₂ από καταλάση [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80019-1)

Το Fe-E αντιπροσωπεύει τον σίδηρο της προσθετικής ομάδας αίμης που συνδέεται με το υπόλοιπο ένζυμο. Αρχικά, στην πρώτη εξίσωση ένα μόριο H₂O₂ εισέρχεται στην προστατική ομάδα της αίμης. Η αίμη Fe²⁺ ανάγει ένα μόριο H₂O₂ σε νερό και παράγει ένα ομοιοπολικό οξυφερρυλικό είδος καθώς και μια ρίζα αίμης. Η ρίζα αποικοδομείται γρήγορα σε μια άλλη αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων, αφήνοντας αναλλοίωτη την προσθετική ομάδα αίμης.

Στην δεύτερη αντίδραση, η ένωση $O=Fe^{3+}$ οξειδώνει το δεύτερο μόριο H_2O_2 για να προκύψει το αρχικό ένζυμο, ένα άλλο μόριο νερού και ένα μόριο οξυγόνου (Vives-Bauza et al. 2007). Η καταλυτική αντίδραση επικρατεί όταν η συγκέντρωση H_2O_2 είναι μεγαλύτερη από 10^{-4} M, ενώ κάτω από 10^{-4} M παρουσία αποδεκτού δότη υδρογόνου, η υπεροξειδωτική αντίδραση κυριαρχεί (Kodydková et al. 2014). Επιπλέον η CAT αδρανοποιείται σε συγκεντρώσεις H_2O_2 πάνω από 0,1 M. (Vives-Bauza et al. 2007).

Το μόριο του NADPH δεσμεύεται στενά από μονολειτουργικές καταλάσες, από ορισμένα βακτήρια και όχι από άλλες καταλάσες (Banerjee R. 2007). Το μόριο αυτό είναι βασικός φορέας οξειδοαναγωγής, έχοντας κρίσιμο ρόλο σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες (κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμός, αποτοξίνωση, ομοιόσταση οξειδοαναγωγής και βιοσύνθεση) (Noctor 2006). Στον μηχανισμό της καταλάσης, το NADPH είναι συνδεδεμένο στις τέσσερις υπομονάδες της και προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στην ένωση I εμποδίζοντας την οξείδωση των αμινοξέων (Εικόνα 1.18). Με αυτόν τον τρόπο, το μόριο NADPH, σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, αποτρέπει την ικανότητα του υποστρώματος της καταλάσης (H_2O_2) να μετατρέψει το ένζυμο στην ανενεργή του μορφή. Στην αντισταθμιστική αυτή διαδικασία το δεσμευμένο NADPH μετατρέπεται σε NADP⁺ και αντικαθίσταται από ένα άλλο μόριο του NADPH, διατηρώντας την καταλάση στην ενεργή της μορφή (Kirkman et al. 1999).



Εικόνα 1.18: Μονομερής δομή της ανθρώπινης CAT, όπου φαίνεται ο θύλακας δέσμευσης του NADPH.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2959186/>

1.7.3 Αντιοξειδωτική δράση και δραστικότητα της CAT

Μεγάλη σημασία κατέχει η αντιοξειδωτική δράση της καταλάσης, καθώς είναι ένα πρωτογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο που συμμετέχει στους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Η καταλάση, όπως προαναφέρθηκε, αποτρέπει την μετατροπή του H_2O_2 στην επιβλαβή $OH^\bullet$ και βρίσκεται σε κάθε είδος κυττάρου (Veskoukis et al. 2012). Επομένως, το ένζυμο αυτό συναντάται σε κύτταρα ζώων, φυτών και αερόβιων βακτηρίων [αναφέρεται ότι και κάποιοι αναερόβιοι οργανισμοί περιέχουν καταλάση (Mhamdi et al. 2010)], ενώ εμφανίζεται στον άνθρωπο σε υψηλή συγκέντρωση στο ήπαρ, στους νεφρούς και στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Sharma et al. 2018). Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ερυθροκύτταρα περιέχουν 1,31-2,71 μg CAT/mg Hb (Kodydková et al. 2014). Αναφέρεται ότι οι κυριότερες μορφές CAT στους ευκαρυώτες είναι αιμοεξαρτώμενες. Οι πιο γνωστές καταλάσες αυτών των μορφών είναι δύο, με τις μονολειτουργικές CATs (τυπικές CATs) και τις διλειτουργικές CAT-υπεροξειδάσες, να ανήκουν στο ενζυμικό οπλοστάσιο κατά του οξειδωτικού στρες (Zamocky et al. 2008). Η CAT εντοπίζεται, επιπλέον, σε μικρότερες συγκεντρώσεις εντός των υπεροξεισωμάτων, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Birben et al. 2012). Ταυτόχρονα, στα περισσότερα είδη ζώων υπάρχει η καταλάση σε κάθε όργανο, με κυριότερο το ήπαρ που βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της (Lobo et al. 2010).

Η δραστικότητα της καταλάσης εκτός από γενετικούς παράγοντες, επηρεάζεται εξίσου και από περιβαλλοντικούς. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκουν η ηλικία, οι εποχιακές αλλαγές, η σωματική δραστηριότητα και η φυσική και χημική επίδραση της καταλάσης, από διάφορες ουσίες που αναστέλλουν τη δραστικότητά της (Kodydková et al. 2014). Πιο συγκεκριμένα, στη διαφοροποίηση της δραστικότητας της καταλάσης, σημαντικό ρόλο φαίνεται να κατέχει και το φύλο των ατόμων (Balog et al. 2006).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ένα από τα πιο δημοφιλή και συχνά καταναλισκόμενα ροφήματα παγκοσμίως είναι ο καφές. Βασικό συστατικό του καφέ είναι η καφεΐνη, η οποία εντοπίζεται και σε άλλα είδη ροφημάτων και φαρμάκων. Το συγκεκριμένο αλκαλοειδές είναι ένα νευροδιεγερτικό του οργανισμού, που εμφανίζει έναν σύνθετο βιοχημικό ρόλο και κατέχει πολλές ιδιότητες. Οι θετικές και οι αρνητικές επιδράσεις της καφεΐνης εξαρτώνται, όπως φαίνεται και από την βιβλιογραφία, από την ποσότητα, το είδος του καφέ και το χρονικό διάστημα κατανάλωσής του. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ανθρώπινος οργανισμός δέχεται τις θετικές αλλά και τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών. Ένας σημαντικός αντιοξειδωτικός αμυντικός μηχανισμός είναι το ένζυμο καταλάση που έχει πολύ υψηλή συγκέντρωση στα ερυθροκύτταρα. Μελέτες συσχετίζουν την καφεΐνη με τη δραστηριότητα της καταλάσης και διερευνούν τα πιθανά οφέλη αυτής της ουσίας στον ανθρώπινο αντιοξειδωτικό μηχανισμό, ωστόσο τα δεδομένα είναι ασαφή. Επομένως, η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της χορήγησης καφεΐνης στη δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση των ερυθροκυττάρων. Απώτερος στόχος αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι να διερευνήσει εάν η χορήγηση καφεΐνης, σε μια δοσολογία που είναι ρεαλιστικό να καταναλωθεί σε καθημερινή βάση, μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα της καταλάσης στο αίμα, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού απέναντι στις ελεύθερες ρίζες.

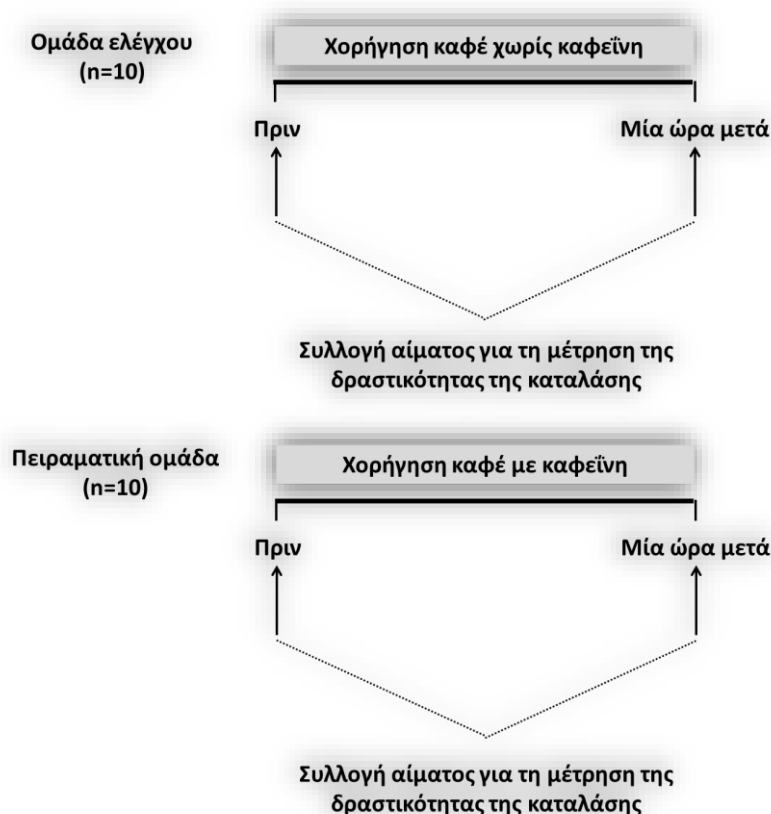
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μεθοδολογία

3.1.1 Σχεδιασμός πειράματος

Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο του 2023 στο Εργαστήριο Κλινικής Εργοφυσιολογίας και Διατροφής του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα Τρίκαλα. Πρόκειται για μια διπλά τυφλοποιημένη μελέτη, στην οποία έλαβαν μέρος 20 συμμετέχοντες. Η πειραματική διαδικασία έλαβε σχετική άδεια από την Εσωτερική Επιτροπή Βιοηθικής του Τμήματος. Επιπλέον, το εργαστήριο ήταν ειδικά διαμορφωμένο για την πραγματοποίηση του πειράματος και τηρούσε τα πρωτόκολλα για την αποφυγή της μετάδοσης του ιού SARS-CoV-2. Η παρέμβαση είχε δύο ομάδες, μία ομάδα ελέγχου (n=10): Συμμετέχοντες που έλαβαν καφέ χωρίς καφεΐνη (ντεκαφεϊνέ) και μία πειραματική ομάδα (n=10): Συμμετέχοντες που έλαβαν καφέ με καφεΐνη (Σχήμα 3.1). Οι συμμετέχοντες κατανεμήθηκαν στις δύο ομάδες σύμφωνα με ένα σύστημα κωδικοποίησης που γνώριζε μόνο ένας εκ των ερευνητών. Αρχικά, πριν την κατανάλωση του καφέ και τη λήψη αίματος από εξειδικευμένη νοσηλεύτρια, οι εθελοντές συμμετέχοντες κλήθηκαν να συμπληρώσουν δύο ερωτηματολόγια σχετικά με την κόπωση και την διάθεση. Ειδικότερα τα ερωτηματολόγια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Σύντομο Ερωτηματολόγιο Κόπωσης (SFQ) και η Συντόμευση του POMS (Ερωτηματολόγιο Διάθεσης / Αναθεωρημένη Έκδοση). Μετά τα ερωτηματολόγια, έγινε μέτρηση του βάρους του κάθε συμμετέχοντα, ενώ τους είχε προταθεί να έχουν ελαφρύ ρουχισμό και να αποφύγουν την κατανάλωση “μεγάλων” γευμάτων πριν την άφιξή τους στον χώρο του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε δύο χρονικές στιγμές και συγκεκριμένα μια πριν από την έναρξη και ειδικότερα πριν την κατανάλωση του καφέ και μια στο τέλος του πειράματος, δηλαδή μετά από μια ώρα. Σύμφωνα με το βάρος υπολογιζόταν η εξατομικευμένη δοσολογία καφεΐνης που ήταν ίση με 3 mg καφεΐνης/kg σωματικού βάρους του κάθε ατόμου, για την παρασκευή του ζεστού στιγμιαίου καφέ. Από τη στιγμή της κατανάλωσης του καφέ, απαγορεύονταν στους συμμετέχοντες η κατανάλωση καφέ, γεύματος και το κάπνισμα. Μετά το πέρας της μιας ώρας, υποβλήθηκαν σε επαναληπτική συμπλήρωση των δύο ερωτηματολογίων, πριν από τη δεύτερη αιμοληψία. Τέλος, η ερευνητική ομάδα πρόσφερε χυμό και σνακ, τόσο για την αποφυγή πιθανής αδιαθεσίας των συμμετεχόντων, όσο και για να τους ευχαριστήσει για τη συμμετοχή

τους. Στόχος της παρέμβασης ήταν να βρεθεί η πιθανή δράση της καφεΐνης τόσο στη δραστικότητα της καταλάσης στο αίμα, όσο και στη διάθεση και την κόπωση. Έπειτα, το αίμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στον χώρο του εργαστηρίου, όπου πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές αναλύσεις.



Σχήμα 3.1: Πειραματικός Σχεδιασμός

3.1.2 Συμμετέχοντες

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε συμμετείχαν 20 άτομα, εκ των οποίων 14 γυναίκες και 6 άνδρες, με ηλικιακό εύρος 18-45 έτη. Τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.2 και 3.3, αντίστοιχα. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν έγκαιρα πριν τη διεξαγωγή του πειράματος για την ώρα άφιξής τους στον χώρο του εργαστηρίου. Υπήρξε επεξήγηση του θέματος του πειράματος και λεπτομερής αναφορά της διαδικασίας, των κριτηρίων συμμετοχής και των πιθανών επιπλοκών. Μάλιστα, κάθε

ενδιαφερόμενος κλήθηκε να συμπληρώσει μια γραπτή φόρμα συναίνεσης πριν τη συμμετοχή του. Όλα τα προσωπικά δεδομένα είναι εμπιστευτικά και μόνο οι ερευνητές έχουν πρόσβαση σε αυτά.

Πιο συγκεκριμένα, οι οδηγίες που δόθηκαν στους συμμετέχοντες ήταν:

- Απαγόρευση κατανάλωσης καφέ για 24 ώρες
- Ελαφρύ γεύμα
- Ελαφριά ή καθόλου σωματική δραστηριότητα και σχετικά ξεκούραστοι και συγκεντρωμένοι
- Ελαφρύ ρουχισμό για αντικειμενική μέτρηση του σωματικού βάρους

Κριτήρια Ένταξης Συμμετεχόντων

Να είναι άνω των 18 ετών

Να μπορεί να καταναλώσει καφέ

Να μην δυσανασχετεί με την αιμοληψία

Σχήμα 3.2: Τα κριτήρια ένταξης των συμμετεχόντων

Κριτήρια Αποκλεισμού Συμμετεχόντων

Κατανάλωση καφέ εντός 24ώρου

Έντονη φυσική δραστηριότητα εντός 24ώρου

Να είναι ασθενής (π.χ. γρίπη, Covid19)

Παρουσία πιθανής αδυναμίας

Να πάσχουν από σοβαρές παθήσεις (π.χ. AIDS, Ηπατίτιδα)

Σχήμα 3.3: Τα κριτήρια αποκλεισμού των συμμετεχόντων

3.1.3 Προμήθεια Καφέ

Ο καφές που επιλέχθηκε για το πείραμα είναι στιγμιαίος καφές της εταιρίας NESCAFE της σειράς CLASSIC και DECAF που διανέμεται από την Nestle Hellas, η οποία είναι πιστοποιημένη σε όλες τις εγκαταστάσεις τις σύμφωνα με τα Συστήματα Περιβαλλοντικής

Διαχείρισης ISO 14001:2015 και Ενεργειακής Διαχείρισης ISO 50001:2018, καθώς και κατά το πρότυπο OHSAS 18001/2007 Υγιεινής και Ασφάλειας στην εργασία.

3.1.4 Συλλογή, χειρισμός και αποθήκευση αίματος

Ολικό αίμα συλλέχθηκε από νοσηλεύτρια στις δύο χρονικές φάσεις του πειράματος, δηλαδή πριν και μετά από μια ώρα από τη κατανάλωση του καφέ, και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια με αντιπηκτικό αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid / EDTA). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4°C, το πλάσμα απομονώθηκε, συλλέχθηκε σε πλαστικά φιαλίδια και αποθηκεύτηκε τελικά στους -80°C για μελλοντική χρήση. Εν συνεχεία, προκειμένου να πραγματοποιηθεί λύση των ερυθροκυττάρων, προστέθηκε απιονισμένο νερό (dH₂O) (1:1 v/v) στο ίζημα των ερυθροκυττάρων και πραγματοποιήθηκε βίαιη ανακίνηση. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 g, για 15 λεπτά, στους 4°C, όπου προέκυψε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (red blood cell lysate, RBCL) εφόσον οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μl). Σε πλαστικά φιαλίδια συλλέχθηκαν 100 μl αιμολύματος για το κάθε δείγμα και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Δραστικότητα Καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στο οποίο υπάρχει η CAT, η δράση της οποίας επεξηγήθηκε παραπάνω, προστίθεται στο H₂O₂, το οποίο είναι το υπόστρωμά της και η αποικοδόμησή του παρακολουθείται από φασματοφωτόμετρο, μέσω της μείωσης της απορρόφησης στα 240 nm.

Αντιδραστήρια:

- Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4) (διατηρείται στο ψυγείο)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για 500 ml του phosphate buffer φτιάχνουμε πρώτα 100 ml KH_2PO_4 (67 mM) και 400 ml Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,91g και τα διαλύουμε σε 100 ml απιονισμένου νερού (dH_2O). Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4,77g και τα διαλύουμε σε 400 ml dH_2O . Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl , 1N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7,4.

- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) 30% (διατηρείται στο ψυγείο)

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,4	2991 μl
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μl

2. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
3. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού σωλήνα σε μία κυψελίδα χαλαζία (Quartz) για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
4. Προσθέτουμε 5 μl 30% H_2O_2 στην κυψελίδα χαλαζία, την ανακινούμε χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 sec.

Υπολογισμοί

$$\text{Δραστικότητα CAT (U/ml)} = (\Delta\text{Abs}_{\text{sample}}/\text{min}/40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2).$$

Όπου, το 40 (mol/l) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/ml}$. Το 750 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του φιαλιδίου (3000 μl) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μl) ($3000/4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

$$\Delta\text{Abs (min)} = \eta \text{ μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό.}$$

Units= $\mu\text{mol}/\text{min}$

$\Delta\text{Abs blank}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

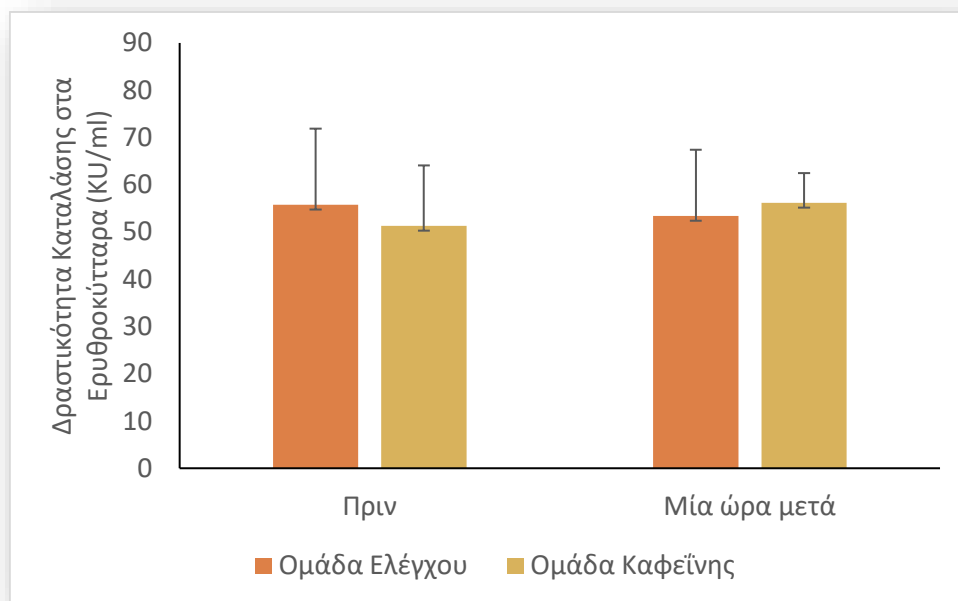
3.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση $\times$ χρόνος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (2-way ANOVA, repeated measures). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (Mean $\pm$ SD). Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα για τις κοινωνικές επιστήμες (statistical package for social sciences, SPSS) (Inc., Chicago, Ill), version 20.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δραστικότητα της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4.1) και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, βρέθηκε ότι η χορήγηση της καφεΐνης δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης των ερυθροκυττάρων των συμμετεχόντων.



Σχήμα 4.1: Η επίδραση της καφεΐνης στη δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των συμμετεχόντων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης στη δραστικότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση στα ερυθροκύτταρα του αίματος. Για τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, χορηγήθηκε ζεστός στιγμιαίος καφές με τη μορφή ροφήματος σε δοσολογία που αντιστοιχεί σε 3 mg/kg σωματικού βάρους, που συνάδει με τη βιβλιογραφία, η οποία αναφέρει ότι 2,4-3 mg/kg σωματικού βάρους μπορούν να φανούν ευεργετικά. Εξίσου σημαντικό είναι, ότι η δόση αυτή αντιστοιχεί σε ένα φλυτζάνι καφέ, το οποίο κρίνεται ασφαλές και ανταποκρίνεται στη μέση καθημερινή κατανάλωση (Evans et al. 2022). Αρχικά, στη διπλά τυφλοποιημένη μελέτη συμμετείχαν 20 εθελοντές ηλικιακού εύρους 18-45 ετών, οι οποίοι ταξινομήθηκαν τυχαία και ισάριθμα σε ομάδα παρέμβασης (κατανάλωση καφέ με καφεΐνη) και ομάδα ελέγχου (placebo: κατανάλωση καφέ χωρίς καφεΐνη, decaf). Στην πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας, λήφθηκε αίμα από κάθε συμμετέχοντα, ο οποίος έπειτα κατανάλωσε τον καφέ που του αντιστοιχούσε και του ζητήθηκε να παραμείνει μια ώρα στον χώρο για να πραγματοποιηθεί η δεύτερη αιμοληψία. Σκοπός της αναμονής των συμμετεχόντων για μια ώρα είναι ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις της καφεΐνης στο πλάσμα του αίματος εμφανίζονται στο πέρας της μιας ώρας από την κατάποση του καφέ (Skinner et al. 2013). Όλα τα δείγματα του αίματος συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε η βιοχημική τους ανάλυση στο εργαστήριο. Έπειτα από την στατιστική ανάλυση των δεδομένων, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των υπό διερεύνηση μεταβλητών. Επομένως, η χορήγηση της καφεΐνης δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης των ερυθροκυττάρων των συμμετεχόντων.

Δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση της καφεΐνης ως αντιοξειδωτικό μόριο μέχρι σήμερα, με τις περισσότερες μελέτες να εντοπίζουν θετική επίδραση της καφεΐνης στην αντιοξειδωτική δράση του αίματος. Συγκεκριμένα, σε μια συστηματική ανασκόπηση που μελέτησε την επίδραση της καφεΐνης, και ειδικότερα τη χορήγηση “καθαρής” καφεΐνης, στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, λαμβάνεται υπόψη τόσο η πηγή της όσο η δόση που χορηγείται και ο βαθμός καβουρδίσματος των κόκκων. Σημαντικό εύρημα της ανασκόπησης είναι ότι τα τεχνητά προϊόντα που περιέχουν καφεΐνη μπορούν να μειώσουν τις ευεργετικές της δράσεις, καθώς η ζάχαρη και τα τεχνητά γλυκαντικά μπορούν να ανταγωνιστούν την αντιοξειδωτική δράση της καφεΐνης και να προκαλέσουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Ősz et al. 2022). Ταυτόχρονα, άλλη μελέτη για την επίδραση του καβουρδίσματος των κόκκων υποστηρίζει ότι η επιλογή τους, οι μέθοδοι παρασκευής (τεχνικές παρασκευής) και οι

παράμετροι αυτών (χρόνος και θερμοκρασία νερού) μπορούν να έχουν σημαντική επίδραση στην αντιοξειδωτική τους δράση. Τα ευρήματα της μελέτης, έπειτα από εκχύλιση σε διαφορετικές θερμοκρασίες καβουρδισμένων και μη κόκκων καφέ Arabica (από τη Βραζιλία, την Κολομβία, την Ινδία, το Περού και τη Ρουάντα) και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράση με *in vitro* μεθόδους, φανέρωσαν ότι η μέθοδος ζεστής παρασκευής οδήγησε σε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, στην περίπτωση των καβουρδισμένων κόκκων (Muzykiewicz-Szymańska et al. 2021). Επιπρόσθετα, μια τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 20 υγιείς εθελοντές ηλικίας 20-65 ετών και διήρκεσε συνολικά οκτώ εβδομάδες, συνέκρινε τις επιδράσεις του καφέ μεσαίου ελαφρού καβουρδίσματος (MLR) και του καφέ μεσαίου καβουρδίσματος (MR) (80 % Coffea arabica και 20 % Robusta) ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα της καφεΐνης, μετρώντας και τη δραστηριότητα της καταλάσης. Οι μετρήσεις της δραστηριότητας του ενζύμου κατά την έναρξη και μετά τις παρεμβάσεις έδειξαν παρόμοιες αντιοξειδωτικές επιδράσεις ανάμεσα στα δύο είδη, με τον MLR να συμβάλλει περισσότερο από τον MR και τη δραστηριότητα της καταλάσης να αυξάνεται κατά 75 και 52 % αντίστοιχα ($P < 0,001$) (Corrêa et al. 2012). Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα της καφεΐνης μελετήθηκε επιτυχώς σε μια έρευνα, η οποία στόχευε στην εξέταση της δυνατότητας αναστολής της οξειδωτικής βλάβης του φακού ποντικών *in vitro* από την καφεΐνη. Μέσω επώασης των φακών σε ένα σύμπλοκο σιδήρου διαλυτού σε υδατικό μέσο, το οποίο προσομοίαζε ένα οξειδωτικό περιβάλλον, με παράλληλες επώσεις καφεΐνης, διαπιστώθηκε η αποτροπή της αλλοίωσης του φακού από την οξείδωση (Varma & Hegde 2010).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, αν και η παρούσα μελέτη δεν παρουσίασε κάποια στατιστική σημαντική συσχέτιση, τα δεδομένα από τις παραπάνω έρευνες υποδηλώνουν ότι η αντιοξειδωτική δράση του καφέ μπορεί να είναι αποτελεσματική και ελπιδοφόρα για την προστασία των βιολογικών συστημάτων από τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Μάλιστα, λόγω της ευρείας κατανάλωσής της, η μελέτη των αντιοξειδωτικών επιδράσεων της καφεΐνης τόσο στα ένζυμα του αίματος όσο και σε άλλους αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες χρήζει ενδελεχούς διερεύνησης.

Βιβλιογραφία

- ¢ Amin, N., Byrne, E., Johnson, J., Chenevix-Trench, G., Walter, S., Nolte, I. M., Vink, J. M., Rawal, R., Mangino, M., Teumer, A., Keers, J. C., Verwoert, G., Baumeister, S., Biffar, R., Petersmann, A., Dahmen, N., Doering, A., Isaacs, A., Broer, L., ... van Duijn, C. M. (2012). Genome-wide association analysis of coffee drinking suggests association with CYP1A1/CYP1A2 and NRCAM. *Molecular Psychiatry*, 17(11), 1116–1129. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.101>
- ¢ Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (2002). The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(11), 845–867. <https://doi.org/10.1074/mcp.R200007-MCP200>
- ¢ Bae, J.-H., Park, J.-H., Im, S.-S., & Song, D.-K. (2014). Coffee and health. *Integrative Medicine Research*, 3(4), 189–191. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.08.002>
- ¢ Baker, W. J., & Theologus, G. C. (1972). Effects of caffeine on visual monitoring. *The Journal of Applied Psychology*, 56(5), 422–427. <https://doi.org/10.1037/h0033520>
- ¢ Balog, T., Sobocanec, S., šverko, V., Krolo, I., Rocić, B., Marotti, M., & Marotti, T. (2006). The influence of season on oxidant-antioxidant status in trained and sedentary subjects. *Life Sciences*, 78, 1441–1447. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.039>
- ¢ Banerjee, R. (2007). *Redox Biochemistry* (1st ed.). Wiley. Retrieved from <https://www.perlego.com/book/2774437/redox-biochemistry-pdf> (Original work published 2007)
- ¢ Banks, N. F., Tomko, P. M., Colquhoun, R. J., Muddle, T. W. D., Emerson, S. R., & Jenkins, N. D. M. (2019). Genetic Polymorphisms in ADORA2A and CYP1A2 Influence Caffeine's Effect on Postprandial Glycaemia. *Scientific Reports*, 9, 10532. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46931-0>
- ¢ Barrera-Reyes, P. K., Hernández-Ramírez, N., Cortés, J., Poquet, L., Redeuil, K., Rangel-Escareño, C., Kussmann, M., Silva-Zolezzi, I., & Tejero, M. E. (2019). Gene expression changes by high-polyphenols cocoa powder intake: A randomized crossover clinical study. *European Journal of Nutrition*, 58(5), 1887–1898. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1736-8>
- ¢ Barone, J. J., & Roberts, H. (1984). Human Consumption of Caffeine. In P. B. Dews (Ed.), *Caffeine: Perspectives from Recent Research* (pp. 59–73). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69823-1_4

- ¢ Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- ¢ Bjørngaard, J. H., Nordestgaard, A. T., Taylor, A. E., Treur, J. L., Gabrielsen, M. E., Munafò, M. R., Nordestgaard, B. G., Åsvold, B. O., Romundstad, P., & Davey Smith, G. (2017). Heavier smoking increases coffee consumption: Findings from a Mendelian randomization analysis. *International Journal of Epidemiology*, 46(6), 1958–1967. <https://doi.org/10.1093/ije/dyx147>
- ¢ Caffeine | EFSA. (2015, April 13). <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/caffeine>
- ¢ Camfield, D. A., Stough, C., Farrimond, J., & Scholey, A. B. (2014). Acute effects of tea constituents L-theanine, caffeine, and epigallocatechin gallate on cognitive function and mood: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 72(8), 507–522. <https://doi.org/10.1111/nure.12120>
- ¢ Campana, C., Griffin, P. L., & Simon, E. L. (2014). Caffeine overdose resulting in severe rhabdomyolysis and acute renal failure. *The American Journal of Emergency Medicine*, 32(1), 111.e3-111.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.08.042>
- ¢ Cappelletti, S., Piacentino, D., Fineschi, V., Frati, P., Cipolloni, L., & Aromatario, M. (2018). Caffeine-Related Deaths: Manner of Deaths and Categories at Risk. *Nutrients*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/nu10050611>
- ¢ Chtourou, H., Trabelsi, K., Ammar, A., Shephard, R. J., & Bragazzi, N. L. (2019). Acute Effects of an “Energy Drink” on Short-Term Maximal Performance, Reaction Times, Psychological and Physiological Parameters: Insights from a Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Counterbalanced Crossover Trial. *Nutrients*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/nu11050992>
- ¢ Crawford, J. (1852). History of Coffee. *Journal of the Statistical Society of London*, 15(1), 50–58. <https://doi.org/10.2307/2338310>
- ¢ Corrêa, T. A. F., Monteiro, M. P., Mendes, T. M. N., Oliveira, D. M. de, Rogero, M. M., Benites, C. I., Vinagre, C. G. C. de M., Mito, B. M., Tarasoutchi, D., Tuda, V. L., César, L. A. M., & Torres, E. A. F. da S. (2012). Medium Light and Medium Roast Paper-Filtered Coffee Increased Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers: Results of a Randomized Trial. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 277–282. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0297-x>
- ¢ Dimaio, V. J. M., & Garriott, J. C. (1974). Lethal caffeine poisoning in a child. *Forensic Science*, 3, 275–278. [https://doi.org/10.1016/0300-9432\(74\)90056-9](https://doi.org/10.1016/0300-9432(74)90056-9)

- ¢ Dong, X., Li, S., Sun, J., Li, Y., & Zhang, D. (2020). Association of Coffee, Decaffeinated Coffee and Caffeine Intake from Coffee with Cognitive Performance in Older Adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011–2014. *Nutrients*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu12030840>
- ¢ Evans, J., Richards, J. R., & Battisti, A. S. (2022). Caffeine. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519490/>
- ¢ Fiani, B., Zhu, L., Musch, B. L., Briceno, S., Andel, R., Sadeq, N., & Ansari, A. Z. (2021). The Neurophysiology of Caffeine as a Central Nervous System Stimulant and the Resultant Effects on Cognitive Function. *Cureus*, 13(5), e15032. <https://doi.org/10.7759/cureus.15032>
- ¢ Finnegan, D. (2003). The health effects of stimulant drinks. *Nutrition Bulletin*, 28(2), 147–155. <https://doi.org/10.1046/j.1467-3010.2003.00345.x>
- ¢ Fredholm, B. B. (2011). Notes on the History of Caffeine Use. In B. B. Fredholm, *Methylxanthines* (Vol. 200, pp. 1–9). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_1
- ¢ Garcia-Yu, I. A., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M. A., Rodriguez-Sanchez, E., Tamayo-Morales, O., Maderuelo-Fernandez, J. A., & Recio-Rodriguez, J. I. (2020). Cocoa-Rich Chocolate and Quality of Life in Postmenopausal Women: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 12(9), 2754. <https://doi.org/10.3390/nu12092754>
- ¢ Glade, M. J. (2010). Caffeine—Not just a stimulant. *Nutrition*, 26(10), 932–938. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.08.004>
- ¢ Grebowski, J., Kazmierska-Grebowska, P., Cichon, N., Konarska, A., Wolszczak, M., & Litwinienko, G. (2022). Fullerenol C60(OH)36 Protects the Antioxidant Enzymes in Human Erythrocytes against Oxidative Damage Induced by High-Energy Electrons. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10939. <https://doi.org/10.3390/ijms231810939>
- ¢ Grosso, G., Micek, A., Castellano, S., Pajak, A., & Galvano, F. (2016). Coffee, tea, caffeine and risk of depression: A systematic review and dose–response meta-analysis of observational studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(1), 223–234. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500620>
- ¢ Grzegorzewski, J., Bartsch, F., Köller, A., & König, M. (2022). Pharmacokinetics of Caffeine: A Systematic Analysis of Reported Data for Application in Metabolic Phenotyping and Liver Function Testing. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 752826. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.752826>

- ¢ Gummin, D. D., Mowry, J. B., Spyker, D. A., Brooks, D. E., Fraser, M. O., & Banner, W. (2017). 2016 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 34th Annual Report. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 55(10), 1072–1252. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1388087>
- ¢ Gurley, B. J., Steelman, S. C., & Thomas, S. L. (2015). Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: History, safety, and efficacy. *Clinical Therapeutics*, 37(2), 275–301. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.08.012>
- ¢ Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- ¢ Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- ¢ Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 101–123. <https://doi.org/10.1080/10408390500400009>
- ¢ Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (1991). Caffeine. In *Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507027/>
- ¢ Hursel, R., Viechtbauer, W., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2009). The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: A meta-analysis. *International Journal of Obesity*, 33(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.135>
- ¢ International Coffee Organization—What's New. (n.d.). Retrieved 29 May 2023, from <http://www.ico.org/>
- ¢ Jameel, S. (2003). Genetically decaffeinated coffee. *Journal of Biosciences*, 28(5), 529–531. <https://doi.org/10.1007/BF02703326>
- ¢ Jeeva, J. S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M., & Krishnan, R. (2015). Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(Suppl 2), S331–S333. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163438>
- ¢ Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., & Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH: KINETICS AND STOICHIOMETRY *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908–13914. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13908>
- ¢ Klosterman, L. (2006). *The facts about caffeine*. New York : Marshall Cavendish Benchmark. <http://archive.org/details/factsaboutcaffei0000klos>

- ¢ Ko, J., Kim, J.-Y., Kim, J.-W., & Yoon, J. S. (2020). Anti-oxidative and anti-adipogenic effects of caffeine in an in vitro model of Graves' orbitopathy. *Endocrine Journal*, 67(4), 439–447. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ19-0521>
- ¢ Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., & Žák, A. (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biologica*, 60(4), 153–167.
- ¢ Kot, M., & Daniel, W. A. (2008). The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: An in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- ¢ Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(13), 718–742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- ¢ Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, e162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- ¢ Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- ¢ Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- ¢ Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology*, 2, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>
- ¢ Meeusen, R., Roelands, B., & Spriet, L. L. (2013). Caffeine, Exercise and the Brain. In L. J. C. van Loon & R. Meeusen (Eds.), *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series* (Vol. 76, pp. 1–12). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000350223>
- ¢ Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197–4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- ¢ Morris, J. (2018). *Coffee: A Global History*. Reaktion Books.

- ¢ Muzykiewicz-Szymańska, A., Nowak, A., Wira, D., & Klimowicz, A. (2021). The Effect of Brewing Process Parameters on Antioxidant Activity and Caffeine Content in Infusions of Roasted and Unroasted Arabica Coffee Beans Originated from Different Countries. *Molecules*, 26(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/molecules26123681>
- ¢ National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Retrieved February 17, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.
- ¢ National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5429, Theobromine. Retrieved February 17, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine>.
- ¢ National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2153, Theophylline. Retrieved February 17, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline>.
- ¢ National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 1188, Xanthine. Retrieved February 17, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Xanthine>.
- ¢ Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*, 20(1), 1–30. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>
- ¢ NCI Thesaurus. (n.d.). Retrieved 22 February 2023, from https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C328
- ¢ Nieber, K. (2017). The Impact of Coffee on Health. *Planta Medica*, 83(16), 1256–1263. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115007>
- ¢ Noctor, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 409–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01476.x>
- ¢ Oba, S., Nagata, C., Nakamura, K., Fujii, K., Kawachi, T., Takatsuka, N., & Shimizu, H. (2010). Consumption of coffee, green tea, oolong tea, black tea, chocolate snacks and the caffeine content in relation to risk of diabetes in Japanese men and women. *British Journal of Nutrition*, 103(3), 453–459. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991966>
- ¢ Oh, Y. S., & Jun, H.-S. (2017). Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 26. <https://doi.org/10.3390/ijms1901002>

- ☿ Ősz, B.-E., Jřtcă, G., Ștefănescu, R.-E., Pușcaș, A., Tero-Vescan, A., & Vari, C.-E. (2022). Caffeine and Its Antioxidant Properties—It Is All about Dose and Source. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms232113074>
- ☿ Popat, R. A., Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Kamel, F., Umbach, D. M., Marder, K., Mayeux, R., Ritz, B., Ross, G. W., Petrovitch, H., Topol, B., McGuire, V., Costello, S., Manthripragada, Angelika. D., Southwick, A., Myers, R. M., & Nelson, L. M. (2011). Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: The caffeine connection in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology : The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 18(5), 756–765. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03353.x>
- ☿ Postuma, R. B., Anang, J., Pelletier, A., Joseph, L., Moscovich, M., Grimes, D., Furtado, S., Munhoz, R. P., Appel-Cresswell, S., Moro, A., Borys, A., Hobson, D., & Lang, A. E. (2017). Caffeine as symptomatic treatment for Parkinson disease (Café-PD). *Neurology*, 89(17), 1795–1803. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004568>
- ☿ Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B., & Gravel, R. A. (1986). Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*, 14(13), 5321–5335.
- ☿ Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2010). Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20 Suppl 1, S3-15. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1379>
- ☿ Rodak, K., Kokot, I., & Kratz, E. M. (2021). Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body—Friend or Foe? *Nutrients*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/nu13093088>
- ☿ Rogers, P. J., Smith, J. E., Heatherley, S. V., & Pleydell-Pearce, C. W. (2008). Time for tea: Mood, blood pressure and cognitive performance effects of caffeine and theanine administered alone and together. *Psychopharmacology*, 195(4), 569–577. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0938-1>
- ☿ Sarniak, A., Lipińska, J., Tytman, K., & Lipińska, S. (2016). Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)*, 70(0), 1150–1165. <https://doi.org/10.5604/17322693.1224259>
- ☿ Schaller, J., Gerber, S., Kaempfer, U., Lejon, S., & Trachsel, C. (2008). Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons
- ☿ Seidl, R., Peyrl, A., Nicham, R., & Hauser, E. (2000). A taurine and caffeine-containing drink stimulates cognitive performance and well-being. *Amino Acids*, 19(3), 635–642. <https://doi.org/10.1007/s007260070013>

- ¢ Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews* ™ in Eukaryotic Gene Expression, 28(2). <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258>
- ¢ Skinner, T. L., Jenkins, D. G., Taaffe, D. R., Leveritt, M. D., & Coombes, J. S. (2013). Coinciding exercise with peak serum caffeine does not improve cycling performance. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 16(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.04.004>
- ¢ Skwarski, M., & Higgins, G. S. (2016). A new roadmap to improve translation of imaging biomarkers. *British Journal of Cancer*, 115(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.374>
- ¢ Smith, A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, 40(9), 1243–1255. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00096-0)
- ¢ Southorn, P. A., & Powis, G. (1988). Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions*. *Mayo Clinic Proceedings*, 63(4), 381–389. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)64861-7](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)64861-7)
- ¢ Steinke, L., Lanfear, D. E., Dhanapal, V., & Kalus, J. S. (2009). Effect of “Energy Drink” Consumption on Hemodynamic and Electrocardiographic Parameters in Healthy Young Adults. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(4), 596–602. <https://doi.org/10.1345/aph.1L614>
- ¢ Turnbull, D., Rodricks, J. V., & Mariano, G. F. (2016). Neurobehavioral hazard identification and characterization for caffeine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 74, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.12.002>
- ¢ Ukers, W. H. (1935). *All about Coffee*. Library of Alexandria.
- ¢ Varma, S. D., & Hegde, K. R. (2010). Prevention of Oxidative Damage to Lens by Caffeine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), 73–78. <https://doi.org/10.1089/jop.2009.0097>
- ¢ Verster, J. C., & Koenig, J. (2018). Caffeine intake and its sources: A review of national representative studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1250–1259. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1247252>
- ¢ Veskokis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2018). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>

- ☿ Veskokoukis, A. S., Paschalis, V., Kyparos, A., & Nikolaidis, M. G. (2018). Administration of exercise-conditioned plasma alters muscle catalase kinetics in rat: An argument for in vivo-like K_m instead of in vitro-like V_{max} . *Redox Biology*, 15, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.001>
- ☿ Veskokoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>
- ☿ Vives-Bauza, C., Starkov, A., & Garcia-Arumi, E. (2007). Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 80, pp. 379–393). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80019-1)
- ☿ V. Καφέξ—Τσάι—Κακάο και προϊόντα του | ΑΑΔΕ. (n.d.). Retrieved 20 February 2023, from <https://www.aade.gr/himeio/v-kafes-tsai-kakao-kai-proionta-toy>
- ☿ Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2040–2045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307301101>
- ☿ Wiklund, U., Karlsson, M., Öström, M., & Messner, T. (2009). Influence of energy drinks and alcohol on post-exercise heart rate recovery and heart rate variability. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 29(1), 74–80. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2008.00837.x>
- ☿ Willson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports*, 5, 1140–1152. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.002>
- ☿ Winston, A. P., Hardwick, E., & Jaber, N. (2005). Neuropsychiatric effects of caffeine. *Advances in Psychiatric Treatment*, 11(6), 432–439. <https://doi.org/10.1192/apt.11.6.432>
- ☿ Wolf, A., Bray, G. A., & Popkin, B. M. (2008). A short history of beverages and how our body treats them. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 9(2), 151–164. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00389.x>
- ☿ Worthley, M. I., Prabhu, A., De Sciscio, P., Schultz, C., Sanders, P., & Willoughby, S. R. (2010). Detrimental Effects of Energy Drink Consumption on Platelet and Endothelial Function. *The American Journal of Medicine*, 123(2), 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.09.013>

- ☉ Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1527–1548. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
- ☉ Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1), 19–66. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3)
- ☉ Zhang, Z., Zhou, S., Jiang, X., Wang, Y.-H., Li, F., Wang, Y.-G., Zheng, Y., & Cai, L. (2015). The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9305-9>
- ☉ Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), 8137–8151. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003>
- ☉ Βερβερίδου Ν. (2021). Κατανάλωση καφέ και γονιμότητα: Υπάρχει συσχέτιση; (Μεταπτυχιακή Εργασία), Δημοκράτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
- ☉ Γάλαρης, Δ. (2015). Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/5113>
- ☉ Γεωργίου Μ., Παστρίκος Μιχαήλ. (2022) Σύγχρονες τεχνικές μάρκετινγκ και ανάλυση συμπεριφοριστικών δεδομένων καταναλωτών. Μελέτη περίπτωσης και κατανάλωσης καφέ στην Ελλάδα. (Πτυχιακή Εργασία), Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα
- ☉ Δημούλα Δ. (2021). Διερεύνηση καταναλωτικών προτύπων καφέ στην ελληνική αγορά (Πτυχιακή Εργασία). Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος
- ☉ Καλαμαρίδη Α. (2015). Λειτουργικές Ιδιότητες του Καφέ (Πτυχιακή Εργασία). Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα
- ☉ Παπαγεωργίου, Γ. Ε. (2009). Βιοχημεία Ελεύθερων ριζών Αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξείδωση. University Studio Press
- ☉ Τσατσάκης, Α. (2022). Τοξικολογία στον σύγχρονο κόσμο. Εκδόσεις Νέον.
- ☉ Τσουμάνης Κ. (2014). Η διαχείριση του αίματος στην Ελλάδα. Η περίπτωση του νομού Ιωαννίνων (Πτυχιακή Εργασία) ΤΕΙ Πελοποννήσου