

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αλέξανδρος Πρίφτης

**«Αποτίμηση της βιοδραστικότητας σε
εκχυλίσματα καφέ»**



2019

«Αποτίμηση της βιοδραστικότητας σε εκχυλίσματα καφέ»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ε. ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ: Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πρίφτης Αλέξανδρος

«Αποτίμηση της βιοδραστικότητας σε εκχυλίσματα καφέ»

Περίληψη

Ο καφές αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή και ευρέως καταναλώσιμα ροφήματα παγκοσμίως, γεγονός που οφείλεται στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (γεύση και άρωμα). Το ρόφημα αυτό δημιουργείται έπειτα από επεξεργασία των κόκκων του φυτού *Coffea sp* και λόγω της φυτικής του προέλευσης χαρακτηρίζεται από πληθώρα βιοδραστικών ουσιών όπως είναι το αλκαλοειδές καφεΐνη και οι πολυφαινόλες. Η μεγάλη κατανάλωση του καφέ σε παγκόσμια κλίμακα έχει προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες για τη διερεύνηση της επίδρασης του ροφήματος αυτού στην ανθρώπινη υγεία. Έχουν προκύψει ποικίλα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες, όμως ο μηχανισμός δράσης του καφέ παραμένει ακόμη άγνωστος.

Για το σκοπό της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν εκχυλίσματα από 12 ποικιλίες καφέ ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Εξετάστηκε τόσο η επίδραση του είδους του καφέ, της προέλευσης των κόκκων, της παρουσίας ή όχι της καφεΐνης και του βαθμού καβουρδίσματος. Όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία συσχετίστηκε ισχυρά με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Σε δεύτερο στάδιο επιλέχθηκαν τρεις αντιπροσωπευτικές ποικιλίες και με τη βοήθεια *in vitro* δοκιμασιών, εκτιμήθηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση, η ικανότητα προστασίας κυτταρικών μακρομορίων καθώς και η επιρροή των εκχυλισμάτων στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τους ενδογενείς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας. Αξίζει να αναφερθεί ο πολύπλοκος μηχανισμός δράσης των εκχυλισμάτων αναλόγως της χορηγούμενης συγκέντρωσης καθώς η βέλτιστη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε υπομέγιστες συγκεντρώσεις. Τελικά, επιλέχθηκε το ισχυρότερο εκχύλισμα και χορηγήθηκε σε επίμυες (σε δόση που αντιστοιχεί σε φυσιολογική καθημερινή κατανάλωση) ώστε να εξεταστεί η επίδρασή του στην οξειδοαναγωγική κατάσταση διάφορων ιστών. Με βάση τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης όλων των ιστών κυρίως λόγω αύξησης των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης μέσω αυξημένης βιοσύνθεσης. Συνολικά, ο καφές σαν ρόφημα παρουσίασε σημαντικές ιδιότητες που τον καθιστούν μια πολύ σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών μορίων μέσω της καθημερινής διατροφής μας έπειτα από κατανάλωση κατάλληλης ποσότητας.

Abstract

Coffee derives from the green beans of the *Coffea sp* plant and is considered to be one of the most popular beverages worldwide due to its stimulating effect and organoleptic properties. Since coffee is a plant-based extract it comprises a plethora of potentially bioactive compounds, including the alkaloid caffeine (coffee's most known substance) and polyphenols (mainly chlorogenic acids). The popularity of this beverage has attracted scientific attention, since numerous studies have examined its potential effects on human health. A vast number of data has been amassed, however the exact molecular mechanism of action remains elusive.

The current work aimed at investigating coffee's bioactivity. To that end, 12 coffee varieties were screened in terms of their antioxidant activity using a range of *in vitro* assays, including radical scavenging capacity, cell redox status assessment and mutagenicity assays. The effects of coffee origin, roasting time and decaffeination were also analyzed. According to the results, all extracts exhibited potent antioxidant activity correlating to their polyphenolic content, however differences were observed between the varieties. Coffee's complex mode of action is noteworthy, since intermediate concentrations exhibited the highest activity.

The most potent coffee extract, according to the screening analysis, was administered in rats (at a dose that equals moderate daily consumption in humans) to examine its effect on blood and tissue redox status as well as whether the *in vitro* results had translational potency *in vivo*. According to the results, coffee greatly affected rat tissues by enhancing antioxidant activity markers (such as the reduced glutathione levels) and lowering macromolecular oxidations, interestingly through a stimulation of endogenous antioxidant mechanisms. Therefore, moderate coffee consumption seems to exert beneficial health effects, rendering it an important source of dietary antioxidants.

ΠΡΙΦΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

«ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΚΑΦΕ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 22

Συνολικός αριθμός σελίδων: 216

Συνολικός αριθμός εικόνων: 29

Συνολικός αριθμός πινάκων: 19

Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 37

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 276

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2015-2018 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Κουρέτα. Χρηματοδοτήθηκε από την Coffee Island SA μέσω σύμβασης με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ενώ μετά το πέρας της χρηματοδότησης λήφθηκε υποτροφία από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ).

Γενικά στοιχεία, σκοπός και σημασία της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια τα αντιοξειδωτικά έχουν απασχολήσει εκτενώς την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία. Σε αυτό το πλαίσιο, ο καφές περιέχει πληθώρα βιοδραστικών ουσιών και έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον καθότι πρόκειται για καθημερινή συνήθεια του σύγχρονου ανθρώπου. Αρκετές μελέτες τονίζουν την προστατευτική δράση της κατανάλωσης καφέ έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρος ούτε ο μοριακός μηχανισμός δράσης, ούτε το είδος και η ποσότητα του καφέ που απαιτούνται σε κάθε περίπτωση. Ο σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro* εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορες ποικιλίες καφέ ανά τον κόσμο (τόσο καβουρδισμένες όσο και πράσινες). Οι ισχυρότερες επιλέχθηκαν με στόχο να μελετηθεί η επίδρασή τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σε βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και στα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, το ισχυρότερο από αυτά χορηγήθηκε σε επίμυες και μετρήθηκαν βιοδείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς και τα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, ώστε να εξεταστεί η επίδραση της κατανάλωσης μέτριας ποσότητας καφέ σε διάφορους ιστούς. Τα αποτελέσματα αναμένεται να βοηθήσουν στη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ μέσω του οποίου επιδρά στον οργανισμό, με τελικό στόχο την βελτιστοποίηση της ποσότητας, του καβουρδίσματος και της ποικιλίας που καταναλώνεται, ειδικά από ανθρώπους που πάσχουν από ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

Ερωτήματα

Τα βασικά ερωτήματα της έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

1. Επιδρά το καβούρδισμα και ο βαθμός καβουρδίσματος στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το πολυφαινολικό περιεχόμενο των πράσινων κόκκων καφέ που προέρχονται από ποικίλες περιοχές ανά τον κόσμο;
2. Τι επίδραση έχουν εκχυλίσματα τόσο πράσινων όσο και καβουρδισμένων κόκκων καφέ από τα δύο κύρια εμπορικά είδη (*C. arabica* και *C. canephora*) στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε επίπεδο κυττάρων;
3. Μέσω ποιων μοριακών μηχανισμών ασκεί ο καφές την πιθανή αντιοξειδωτική του δράση;
4. Οι ισχυρές ιδιότητες που παρουσιάζει *in vitro*, εμφανίζονται και *in vivo*;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή:

1. Priftis A, Stagos D, Tzioumakis N, Konstantinopoulos K, Patouna A, Papadopoulos GE, Tsatsakis A, Kouretas D.: Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep* 12: 7293–7302, 2015.
2. Priftis A, Papikinos K, Koukoulanaki M, Kerasioti E, Stagos D, Konstantinopoulos K, Spandidos DA, Kermenidou M, Karakitsios S, Sarigiannis D, Tsatsakis AM, Kouretas D. Development of an assay to assess genotoxicity by particulate matter extract. *Mol Med Rep.* 2017 Apr;15(4):1738-1746. doi: 10.3892/mmr.2017.6171. Epub 2017 Feb 6.
3. Priftis A, Goutzourelas N, Halabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Amoutzias GD, Skaltsounis LA, Kouretas D. Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev.* 2017 Nov 23. pii: S0047-6374(17)30155-0. doi: 10.1016/j.mad.2017.11.015.
4. Priftis A, Panagiotou EM, Lakis K, Plika C, Halabalaki M, Ntasi G, Veskoukis AS, Stagos D, Skaltsounis LA, Kouretas D. Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food Chem Toxicol.* 2018 Apr;114:119-127. doi: 10.1016/j.fct.2018.02.029. Epub 2018 Feb 13
5. Priftis A., Mitsiou D., Halabalaki M., Ntasi G., Stagos d., Skaltsounis LA., Kouretas D. Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mut Res.* 2018 May-Jun, 829-830, 33-42.

6. Priftis A., Angeli-Terzidou AE., Veskoukis AS., Spandidos DA., Kouretas D.
Cell-specific and roasting-dependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Mol Med Rep.* 2018 Jun;17(6):8325-8331. doi: 10.3892/mmr.2018.8924.
7. Priftis A., Soursou V, Makiou AS, Tekos F, Veskoukis AS, Tsantarliotou MP, Taitzoglou IA, Kouretas D. A lightly roasted coffee extract improves blood and tissue redox status in rats through enhancement of GSH biosynthesis. *Food Chem Toxicol.* 2019 Jan 14;125:305-312. doi: 10.1016/j.fct.2019.01.012.

Ευχαριστίες

Καταρχάς θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τα αδέρφια μου που είχαν παροιμιώδη υπομονή μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια που σπούδαζα, ήταν και είναι πάντα στο πλευρό μου και μου έμαθαν πώς να αντεπεξέρχομαι σε οποιαδήποτε δυσκολία συναντώ.

Ακόμα, δεν γίνεται παρά να ευχαριστήσω (αφού δεν μπορώ να τους χτίσω προτομή) τους συνοδοιπόρους μου σε αυτό τον δύσκολο δρόμο του διδακτορικού, Ακη Σπανίδη, Σωτηρί(ν)α Μακρή, Βίβιαν (ή Παρασκευή σύμφωνα με άλλες πηγές) Κούκα, κυρ Κώστα Γερασόπουλο, Νίκο (πως) Γκουτζουρέλα, και Ευθαλία Κερασιώτη. Μοιραστήκαμε άπειρες στιγμές και καλές και κακές που ξεπερνούν το στενό πλαίσιο του εργαστηρίου ενώ σε έκταση ξεπερνούν κατά πολύ την παρούσα διατριβή και θα μας μείνουν για πάντα χαραγμένες στη μνήμη.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την πληθώρα προπτυχιακών και μεταπτυχιακών φοιτητών με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια της πτυχιακής τους όλα αυτά τα χρόνια (με χρονολογική σειρά: Αναστασία Πατούνα, Μαρίνα Κουκουλανάκη, Έρη Παναγιώτου, Δήμητρα Μήτσιου, Κωνσταντίνος Λάκης, Χριστίνα Πλύκα, Βάσια Σούρσου και Ανθή Μάκιου).

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία να πραγματοποιήσω το διδακτορικό μου στο εργαστήριο του. Η συνεργασία μας πέρασε από δοκιμασίες όλα αυτά τα χρόνια καθώς δεν είμαι και ο πιο εύκολος χαρακτήρας, αλλά συνέβαλε τα μέγιστα στο να διαμορφώσει τον τρόπο σκέψης και κρίσης μου και μου δίδαξε τι σημαίνει αντοχή σε όλα τα επίπεδα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Δημήτριο Στάγκο που συνέβαλε με τις γνώσεις και την εμπειρία του, στην επίλυση διαφόρων τεχνικών προβλημάτων που συνάντησα, καθώς και για τις διορθώσεις και τις υποδείξεις του στις δημοσιεύσεις μου.

.....Αφιερωμένο στον Στέφανο που είμαι σίγουρος ότι με προσέχει από εκεί ψηλά

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	6
Abstract	7
Πρόλογος	9
Ευχαριστίες	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	20
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	21
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	22
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
1.1 Καφές	25
1.1.1 Γενικά	25
1.1.2 Χημική σύσταση του καφέ	26
1.1.2.1 Καφεΐνη	26
1.1.2.2 Χλωρογενικά οξέα (CGA)	27
1.1.2.3 Καφεστόλη και καφεόλη	29
1.1.2.4 Μελανοϊδίνες	29
1.1.3 Επίδραση του καφέ στην υγεία	31
1.2 Ελεύθερες ρίζες	32
Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών	34
1.3 Είδη Ελευθέρων Ριζών	35
1.3.1 Ανιόν σουπεροξειδίου (Σουπεροξείδιο)	35
1.3.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	35
1.3.3 Ρίζα Υδροξυλίου (HO·)	35
1.4 Παραγωγή ελευθέρων ριζών από ενδογενείς πηγές	36
1.4.1 Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση	36

1.4.2	Δράση οξειδάσης της ξανθίνης (XO)	37
1.4.3	Φλεγμονή.....	37
1.4.4	Άλλες πηγές.....	38
1.5	Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	38
1.6	Βιολογικές δράσεις των δραστικών μορφών	39
1.7	Οξειδωτικό στρες.....	40
1.8	Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	42
1.8.1	Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας.....	43
1.8.1.1	Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	43
1.8.1.2	Καταλάση (CAT)	44
1.8.1.3	Θειορεδοξίνη (Trx)	44
1.8.1.4	Οξυγενάση της αίμης (HO-1)	45
1.8.1.5	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2)	46
1.8.1.6	NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (NQO1)	48
1.8.1.7	Παραοξονάση (PON).....	49
1.8.1.8	Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).....	49
1.8.1.9	Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).....	50
1.8.1.10	Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)	50
1.8.1.11	Λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL)	51
1.8.2	Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας.....	51
1.8.2.1	Βιταμίνες C και E	52
1.8.2.2	Γλουταθειόνη.....	52
1.8.2.3	Ουβικινόνη.....	53
1.8.2.4	Τελικά προϊόντα καταβολισμού ενδογενών ενώσεων (Ουρικό οξύ και Χολερυθρίνη).....	53
1.8.2.5	Πολυφαινόλες.....	53

Σκοπός της έρευνας	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων καφέ	62
2.1.1 Δείγματα καφέ και προετοιμασία εκχυλισμάτων	64
2.1.2 Προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu	65
2.1.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών	66
2.1.3.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH*	66
2.1.3.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS**	67
2.1.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας	68
2.1.4 Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος	69
2.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης έναντι της πρόκλησης ρήξεων στο DNA από ελεύθερες ρίζες	69
2.1.5.1 Μέθοδοι χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assays)	69
2.1.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	70
2.1.5.3 Επαγόμενη από ρίζες ROO* πρόκληση μονόκλωνων ρήξεων στο DNA	71
2.1.5.4 Επαγόμενη από ρίζες HO* πρόκληση μονόκλωνων ρήξεων στο DNA.....	72
2.1.5.5 Προσδιορισμός της προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων καφέ έναντι της επαγόμενης από ελεύθερες ρίζες πρόκλησης μονόκλωνων ρήξεων στο DNA	72
2.1.6 Στατιστική ανάλυση	73
2.2 Αποτελέσματα	74
2.2.1 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων καφέ	74
2.2.2 Εξουδετέρωση ρίζας DDPH.....	75
2.2.3 Εξουδετέρωση ρίζας ABTS**	76
2.2.4 Αναγωγική ισχύς	77
2.2.5 Αναστολή της επαγόμενης από το AAPH - πλασμιδιακής χαλάρωσης	78
2.2.6 Αναστολή της επαγόμενης από την ακτινοβολία UV-πλασμιδιακής χαλάρωσης	79
2.2.7 Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών	80

2.3 Συζήτηση	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων	89
3.1 Υλικά και μέθοδοι	91
3.1.1 Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926	91
3.1.2 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του καφέ με τη μέθοδο ΧΤΤ	91
3.1.3 Χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ στις δυο κυτταρικές σειρές	93
3.1.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	93
3.1.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	94
3.1.6 Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS	95
3.1.7 Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	96
3.1.8 Εκτίμηση γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών	97
3.1.9 Εκτίμηση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real-time PCR	97
3.1.9.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA	97
3.1.9.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων	98
3.1.10 Εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\cdot-}$	100
3.1.11 Εξουδετέρωση της ρίζας HO^{\cdot}	101
3.1.12 Επίδραση στη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα	102
3.1.12.1 Αναστολή δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης (XO)	102
3.1.12.2 Συλλογή και προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος	102
3.1.12.3 Αναστολή δραστικότητας της καταλάσης	102
3.1.13 Τεστ του Ames	103
3.1.13.1 Μηχανισμός δράσης του t-BOOH.....	104
3.1.13.2 Δοκιμασία εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων καφέ	104
3.1.13.3 Μεταβολική ενεργοποίηση με το μίγμα μεταβολικών ενζύμων S9	105

3.1.13.4 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας.....	105
3.1.13.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης	106
3.1.14 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων καφέ μέσω χρωματογραφίας	106
3.1.14.1 Ανάλυση με UHPLC-HRMS	106
3.1.14.2 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της καφεΐνης	107
3.1.14.3 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γλωρογενικού οξέος	108
3.1.15 Στατιστική ανάλυση	109
3.2 Αποτελέσματα	110
3.2.1 Κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου ΧΤΤ	110
3.2.1.1 C2C12	110
3.2.1.2 EA.hy926	112
3.2.2 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, TBARS και CARB	115
3.2.2.1 C2C12	115
3.2.2.2 EA.hy926	119
3.2.3 Αποτελέσματα αποτίμησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυτοιχιών.....	122
3.2.4 Αποτελέσματα αποτίμησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω real-time PCR	124
3.2.4.1 C2C12	124
3.2.4.2 EA.hy926	126
3.2.5 Εξουδετέρωση ριζών σουπεροξειδίου (O_2^-) και υδροξυλίου (HO^{\cdot})	127
3.2.6 Αναστολή δραστηριότητας οξειδάσης της ξανθίνης (XO) και της καταλάσης (CAT)	128
3.2.7 Τεστ του Ames	129
3.2.7.1 Τεστ του Ames χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση	129
3.2.7.2 Τεστ του Ames με μεταβολική ενεργοποίηση.....	133
3.2.8 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση σύστασης.....	138
3.2.9 Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών	142

3.3 Συζήτηση	144
3.3.1 Κυτταροτοξικότητα εκχυλισμάτων καφέ.....	145
3.3.2 Επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών	146
3.3.3 Επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	150
3.3.4 Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.....	153
3.3.5 Ικανότητα αναστολής ριζών σουπεροξειδίου και υδροξυλίου	159
3.3.6 Ικανότητα αναστολής των XO και CAT	160
3.3.7 Τεστ του Ames	161
3.3.8 Ανάλυση σύστασης.....	162
3.3.9 Προτεινόμενοι μοριακοί μηχανισμοί δράσης του καφέ	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Επίδραση εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση και την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων επιμύων	167
4.1 Χορήγηση καφέ σε επίμυες και συλλογή ιστών.....	169
4.1.1 Εκχύλισμα καφέ και πειραματική διαδικασία.....	169
4.1.2 Συλλογή αίματος και ιστών.....	169
4.1.3 Επεξεργασία αίματος και ομογενοποίηση ιστών.....	169
4.1.3.1 Επεξεργασία αίματος.....	169
4.1.3.2 Ομογενοποίηση ιστών	170
4.1.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης	170
4.1.4.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford.....	170
4.1.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης	170
4.1.4.3 Ικανότητα διάσπασης H ₂ O ₂	171
4.1.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).....	172
4.1.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	173
4.1.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	173
4.1.5 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων του Nrf2 μέσω Real-time PCR.....	174

4.1.6 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς	174
4.1.7 Στατιστική Ανάλυση	175
4.2 Αποτελέσματα	176
4.2.1 Δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα.....	176
4.2.2 Δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς	177
4.2.2.1 Επίπεδα GSH	177
4.2.2.2 Αποικοδόμηση H ₂ O ₂	178
4.2.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)	179
4.2.2.4 Λιπιδική υπεροξείδωση (TBARS)	180
4.2.2.5 Πρωτεϊνική οξείδωση (CARB)	181
4.2.3 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης	182
4.2.4 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών	183
4.3 Συζήτηση.....	184
4.3.1 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση.....	184
4.3.2 Επίδραση του καφέ στην έκφραση γονιδίων και αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών	186
4.3.3 Συμπεράσματα.....	187
Βιβλιογραφία	189

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή της καφεΐνης.....	27
Εικόνα 2: Δομές των χλωρογενικών οξέων	28
Εικόνα 3: Δομή της καφεστόλης και της καφεόλης.....	29
Εικόνα 4: Προτεινόμενη δομή του σκελετού μελανοϊδινών. Από (26).....	30
Εικόνα 5: Απεικόνιση των δεσμών και της ηλεκτρονιακής στροφορμής στις διάφορες μορφές του διατομικού μορίου του οξυγόνου	33
Εικόνα 6: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	34
Εικόνα 7: Αναπνευστική αλυσίδα.....	36
Εικόνα 8: Μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών από την οξειδάση της ζανθίνης	37
Εικόνα 9: Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	39
Εικόνα 10: Αλληλεπίδραση της γουανίνης του DNA με ROS που οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυδιογουανοσίνης (8-OHdG).	40
Εικόνα 11: Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας	41
Εικόνα 12: Σύνοψη της αλληλεπίδρασης ενδογενών/εξωγενών αντιοξειδωτικών με τα οξειδωτικά μόρια.....	43
Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης της Txp.....	45
Εικόνα 14: Καταβολισμός της αίμης.....	46
Εικόνα 15: Ρύθμιση του Nrf2. Πηγή: (85)	47
Εικόνα 16: Γονίδια-στόχοι του Nrf2. Πηγή: (89).	48
Εικόνα 17: Ο μηχανισμός δράσης της NQO1	49
Εικόνα 18: Ο μηχανισμός δράσης της GPx	50
Εικόνα 19: Δομή της γλουταθειόνης.....	53
Εικόνα 20: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος	66
Εικόνα 21: Αλληλεπίδραση της ρίζας DPPH• με ένα αντιοξειδωτικό	67
Εικόνα 22: Παραγωγή της σταθερής ρίζας ABTS*+.....	68
Εικόνα 23: Μετατροπή του XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη	92
Εικόνα 24: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.....	95
Εικόνα 25: Μηχανισμός δράσης του <i>t</i> -BOOH.....	104
Εικόνα 26: Απεικόνιση των μοριακών ιόντων της καφεΐνης και της ρεζερπίνης με την δοκιμασία SIM.....	108
Εικόνα 27: Τα τρία ισομερή του χλωρογενικού οξέος.....	108
Εικόνα 28: Διαχωρισμός των τριών κύριων ισομορφών χλωρογενικού οξέος (μαύρο χρώμα) και της ρεζερπίνης (κόκκινο χρώμα) με την δοκιμασία SIM	109
Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση μηχανισμών δράσης του καφέ	166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Κατηγορίες φλαβονοειδών	55
Πίνακας 2.	Χημική δομή των πολυφαινολικών οξέων	57
Πίνακας 3.	Ονομασία και χρόνος καβουρδίσματος ποικιλιών καφέ	64
Πίνακας 4.	Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στους πράσινους κόκκους	80
Πίνακας 5.	Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στους καβουρδισμένους κόκκους	81
Πίνακας 6.	Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στο σύνολο των εκχυλισμάτων	82
Πίνακας 7.	Αλληλουχίες εκκινήτων για τους μυοβλάστες	99
Πίνακας 8.	Αλληλουχίες εκκινήτων για τα ενδοθηλιακά κύτταρα	100
Πίνακας 9.	Πρωτόκολλο UHPLC	107
Πίνακας 10.	Κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων καφέ στις δύο κυτταρικές σειρές	114
Πίνακας 11.	Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών	116
Πίνακας 12.	Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων	120
Πίνακας 13.	Επίδραση του εκχυλίσματος Brazil R4 (400 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων των μυοβλαστών	123
Πίνακας 14.	Το σύνολο των ενώσεων που εντοπίστηκαν στα εκχυλίσματα καφέ	138
Πίνακας 15.	Ποιοτική σύγκριση της παρουσίας διάφορων ενώσεων στα εκχυλίσματα καφέ	140
Πίνακας 16.	Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε καφεΐνη και μονοκαφεϋλοκινικά οξέα	141
Πίνακας 17.	Συσχέτιση μεταξύ των βιοδεικτών στα κύτταρα	142
Πίνακας 18.	Συσχέτιση μεταξύ του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC), του τεστ του Ames (IC50) και της εξουδετέρωσης των ριζών (ειδική ενεργότητα)	143
Πίνακας 19.	Οι ακολουθίες των εκκινήτων για τους επίμυες	174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.	Folin-Ciocalteu	74
Διάγραμμα 2.	DPPH*	75
Διάγραμμα 3.	ABTS ⁺	76
Διάγραμμα 4.	Αναγωγική ισχύς	77
Διάγραμμα 5.	Πλασμιδιακή χαλάρωση λόγω AAPH	78
Διάγραμμα 6.	Πλασμιδιακή χαλάρωση λόγω UV	79
Διάγραμμα 7.	Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Brazil στους μυοβλάστες	110
Διάγραμμα 8.	Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Robusta και Decaf στους μυοβλάστες	111
Διάγραμμα 9.	Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Brazil στα ενδοθηλιακά κύτταρα	112
Διάγραμμα 10.	Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Robusta και Decaf στα ενδοθηλιακά κύτταρα	113
Διάγραμμα 11.	Η επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυοβλαστών	115
Διάγραμμα 12.	Η επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων	119
Διάγραμμα 13.	Επίδραση των εκχυλισμάτων Brazil R4 και πράσινου στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στους μυοβλάστες	124
Διάγραμμα 14.	Επίδραση των εκχυλισμάτων Brazil R4 και πράσινου στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα	126
Διάγραμμα 15.	Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να εξουδετερώνουν τις ρίζες σουπεροξειδίου και υδροξυλίου	127
Διάγραμμα 16.	Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των της οξειδάσης της ξανθίνης και της καταλάσης	128
Διαγράμματα 17-29.	Τεστ του Ames	129-136
Διαγράμματα 30-35.	Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα και τους ιστούς επιμύων	176-181
Διαγράμματα 36-37.	Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε ιστούς επιμύων	182-183

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CGA	Chlorogenic Acid	Χλωρογενικό οξύ
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
O₂^{•-}	Superoxide radical	Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος
HO[•]	Hydroxyl radical	Ρίζα υδροξυλίου
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Catalase	Καταλάση
GPx	Glutathione peroxidase	Περοξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Glutathione reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH	Reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Oxidized glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
MDA	Malondialdehyde	Μηλονική διαλδεΰδη
TBARS	Thiobarbituric Reactive Substances	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
DPPH[•]	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1 διφαινυλ-2-πικριδραζύλιο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
t-BOOH	Tert-butyl-hydroperoxide	Τριτ-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	
PBS	phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καφές

1.1.1 Γενικά

Ο καφές είναι εξαιρετικά δημοφιλής ως ρόφημα λόγω του αισθήματος διέγερσης που προκαλεί ελέω καφεΐνης καθώς και της γεύσης και του αρώματος του. Πρόκειται, μαζί με το τσάι, για το ρόφημα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση παγκόσμια μετά το νερό με τη συνολική παραγωγή του να ξεπερνά τα 8.700.000 kg το 2013 (Διεθνής Οργανισμός Καφέ ICO, 2013). Εκτιμάται ότι >2 δισεκατομμύρια φλιτζάνια καφέ καταναλώνονται κάθε μέρα και είναι χαρακτηριστικό πως οι Αμερικανοί και μόνο ξοδεύουν ~ 40 δισεκατομμύρια δολάρια κάθε χρόνο για καφέ (1).

Οι κόκκοι του καφέ προέρχονται από τα αντίστοιχα καφεόδεντρα (της οικογένειας *Rubiaceae*) και μέχρι σήμερα έχουν γίνει γνωστά 103 διαφορετικά είδη. Από αυτά όμως, μόνο 2 χρησιμοποιούνται για την εμπορική παραγωγή και συγκεκριμένα το είδη *Coffea arabica* (καφέ Arabica) και *Coffea canephora* (καφέ Robusta) αντιστοιχώντας περίπου στο 80% και 20% της παγκόσμιας αγοράς καφέ, αντίστοιχα (2). Μόλις ωριμάσουν, οι καρποί του φυτού συλλέγονται, επεξεργάζονται και αποξηνούνται. Σε εκείνο το σημείο είναι πράσινοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία των αντίστοιχων εμπορικών εκχυλισμάτων. Ακολούθως, οι κόκκοι καβουρδίζονται για διαφορετικό χρονικό διάστημα αναλόγως με την επιθυμητή τελική γεύση (3). Αξίζει να σημειωθεί πως μια τεχνητή διαδικασία που μπορεί να προηγηθεί του ψησίματος του καφέ είναι η «αποκαφεϊνοποίηση», δηλαδή η παραγωγή του «ντεκαφεϊνέ» ροφήματος. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τους «πράσινους» κόκκους καφέ (4).

Ο *Coffea arabica* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1753 και πρόκειται για ένα ευμεγέθη θάμνο με πράσινα ωοειδή φύλλα. Οι καρποί του φυτού έχουν παρομοίως, ωοειδές σχήμα και ωριμάζουν σε χρονικό ορίζοντα 7 έως 9 μηνών. Διαθέτει τέσσερα αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος και γι' αυτό το λόγο διαφέρει γενετικά από τα υπόλοιπα είδη που έχουν μόνο δύο αντίγραφα. Εντούτοις, ο arabica είναι αρκετά ευάλωτος σε βιοτικές καταπονήσεις (5).

Από την άλλη, ο *Coffea canephora* ονομάζεται και Robusta (εύρωστο) εξαιτίας της δύναμής του κορμού του. Έχει μεγαλύτερο μέγεθος, προσομοιάζοντας μικρό δένδρο καθώς φτάνει έως και τα 10 m ύψος. Οι καρποί του φυτού έχουν στρογγυλό σχήμα απαιτώντας περίπου 11 μήνες για την ωρίμανσή τους, ενώ οι σπόροι έχουν ωοειδές σχήμα και υπολείπονται εμφανώς σε μέγεθος των αντίστοιχων του *Coffea arabica*. Ενδεικτικό της ευρωστίας του είναι ότι αναπτύσσεται σε

θερμότερα κλίματα από τον *arabica*, συμπεριλαμβανομένων περιοχών όπως η δυτική και κεντρική Αφρική και η νοτιοανατολική Ασία (5). Τα καφεόδεντρα αποδίδουν καρπούς έπειτα από την πάροδο περίπου 3-4 ετών. Κάθε δένδρο αποδίδει 2-4kg καρπούς, και αναλογικά τα 100 kg καρπών αποδίδουν 12-20 kg έτοιμου καφέ.

Το είδος *arabica* είναι πιο διαδεδομένο (χαρακτηριστικό είναι ότι καλύπτει το 75% της καλλιέργειας καφέ σε παγκόσμια κλίμακα) καθώς έχει λιγότερο πικρή επίγευση από το *Coffea canephora*. Αυτό οφείλεται κυρίως στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα του δεύτερου σε χλωρογενικά οξέα (CGA), ένα είδος πολυφαινόλων οι οποίες είναι γνωστό ότι προσδίδουν πικρή γεύση. Ακόμα, μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών είναι η περιεκτικότητα σε καφεΐνη, όπου και πάλι ο *robusta* περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα σε ποσοστό 30–40%. Για το λόγο αυτό θεωρείται πιο οικονομικός και συχνά χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του *arabica*.

1.1.2 Χημική σύσταση του καφέ

Ο καφές περιέχει άνω των 1.000 συστατικών, όντας έτσι ένα σύνθετο μίγμα (1). Μεταξύ άλλων αποτελείται από υδατάνθρακες, λιπίδια, βιταμίνες, αζωτούχες ενώσεις, ισοφλαβονοειδή, και μικροθρεπτικά συστατικά. Τα κύρια συστατικά του καφέ είναι το αλκαλοειδές καφεΐνη, τα διτερπένια καφεστόλη και καφεόλη, ένα σύνολο πολυφαινολικών ισομερών, τα χλωρογενικά οξέα καθώς και μικροθρεπτικά συστατικά (6). Ακόμα, ως συνέπεια της διαδικασίας του καβουρδίσματος είναι η παραγωγή των μελανοιδινών. Ο τύπος του κόκκου καφέ, η διαδικασία καβουρδίσματος καθώς και η διαδικασία παρασκευής/βρασμού επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη χημική σύσταση του ροφήματος καφέ που καταναλώνεται.

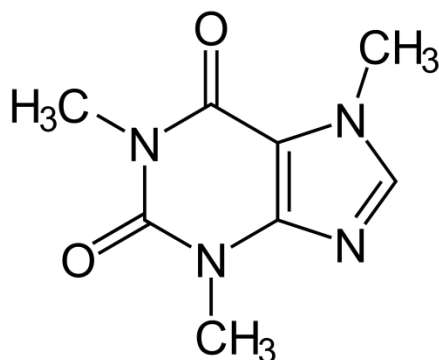
Οι σημαντικότερες πολυφαινόλες του καφέ είναι τα χλωρογενικά οξέα και οι μεταβολίτες τους, συμπεριλαμβανομένων το καφεϊκό, το κινικό και το φερουλικό οξύ (7).

Οι πράσινοι κόκκοι καφέ αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, χλωρογενικά οξέα, τριγονελλίνη και καφεΐνη (2). Τα χλωρογενικά οξέα, η καφεΐνη και τα λιπιδικά διτερπένια θεωρούνται τα πιο βιοενεργά συστατικά ενώ παράλληλα διαμορφώνουν σε μεγάλο βαθμό τη γεύση του ροφήματος.

1.1.2.1 Καφεΐνη

Πρόκειται για μία θερμοανθεκτική μεθυλοξανθίνη με πικρή γεύση και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι κόκκοι του είδους *C. canephora* περιέχουν περισσότερη σε σχέση με αυτούς του *C. arabica*. Πέρα από το είδος του καφέ, ωστόσο, την τελική συγκέντρωση στο ρόφημα την

καθορίζουν τόσο η δοκιμασία παρασκευής όσο και ο τύπος του ροφήματος. Η συγκέντρωσή της στο τελικό ρόφημα επηρεάζεται από το χρόνο παρασκευής, τη θερμοκρασία, το άλεσμα και τον τύπο του καφέ. Ένα φλιτζάνι καφέ εσπρέσο περιέχει 80-100 mg καφεΐνης ενώ ένα φλιτζάνι καφέ φίλτρου 100-125 mg. Η καφεΐνη απορροφάται τάχιστα (σε <30 λεπτά) από το γαστρεντερικό σωλήνα και κατανέμεται στη συνέχεια σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου (6). Έχει διάφορες βιολογικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων η διουρητική δράση, η επαγωγή καρδιακού ρυθμού, η περιφερική αγγειοσυστολή, η διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος και η χαλάρωση των λείων μυών (2). Η πρόσληψη καφεΐνης έχει συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών του ήπατος (πχ κίρρωση) (8), ενώ σημαντική *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν παρουσιάσει μεταβολίτες της καφεΐνης (1-μεθυλοξανθίνη και 1-μεθυλουρικό) (9).



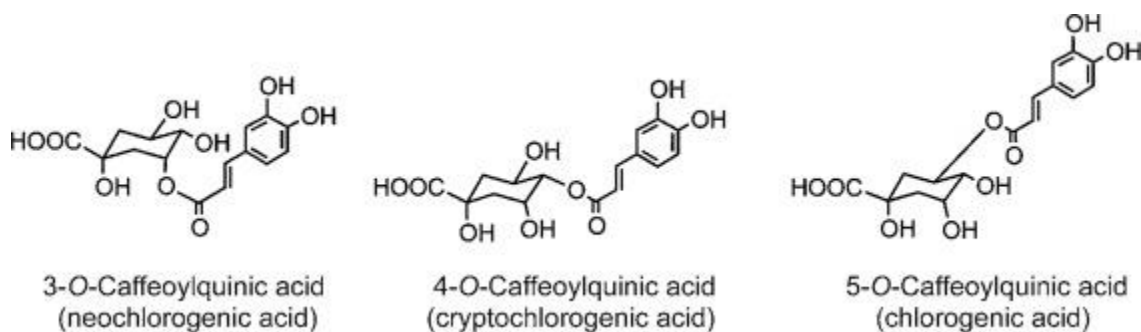
Εικόνα 1: Δομή της καφεΐνης

1.1.2.2 Χλωρογενικά οξέα (CGA)

Τα τελευταία χρόνια μια σειρά επιδημιολογικών και κλινικών μελετών αναφέρουν πως η κατανάλωση καφέ, ανεξαρτήτως της πρόσληψης καφεΐνης, συσχετίζεται με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία καθώς μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, νευροεκφυλιστικών και μεταβολικών νόσων (10–13) Αυτές οι επιδράσεις αποδόθηκαν στα χλωρογενικά οξέα έπειτα από *in vitro* μελέτες και έρευνες σε ζώα (14–16).

Πρόκειται για πολυφαινολικές ενώσεις που σχηματίζονται από την εστεροποίηση κινναμικών οξέων, όπως το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, με το κινικό οξύ. Τα τρία κύρια ισομερή που απαντώνται στον καφέ απεικονίζονται στην Εικόνα 2. Τα χλωρογενικά οξέα χαρακτηρίζονται από πικρή γεύση και οξύτητα προσδίδοντας αυτά τα γνωρίσματα και στο ρόφημα. Λόγω της παρατηρούμενης οξειδωσης και αποικοδόμησής τους κατά το καβούρδισμα, σχηματίζονται

προϊόντα με ακόμα πιο έντονη πικράδα, ειδικά αν η αρχική συγκέντρωση των χλωρογενικών οξέων στον πράσινο κόκκο είναι υψηλή (17). Ο πράσινος καφές είναι μια σημαντική φυσική πηγή CGA καθώς περιέχει 5-12 g CGA/100 g. Το είδος Robusta περιέχει περίπου διπλάσια ποσότητα χλωρογενικών οξέων συγκριτικά με το arabica (αν και αυτή η διαφορά ποικίλλει σημαντικά). Τα χλωρογενικά οξέα είναι ασταθείς ενώσεις όταν υφίστανται θερμική κατεργασία κι έτσι όταν καβουρδίζονται οι κόκκοι, παρατηρείται ισομερισμός, επιμερισμός, κατακερματισμός σε μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεις, καθώς και ενσωμάτωση σε μελανοϊδίνες. Τα ανωτέρω παράγωγα συμβάλλουν στο τελικό χρώμα και στη γεύση του ροφήματος.



Εικόνα 2: Δομές των χλωρογενικών οξέων

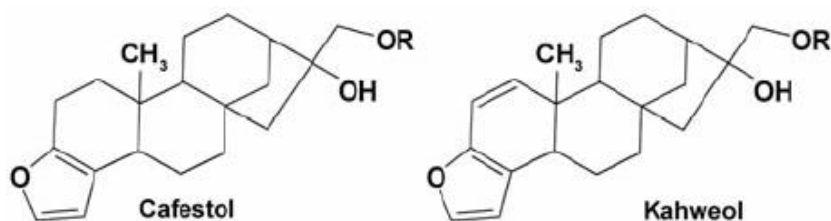
Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα χλωρογενικά οξέα και τις πιθανές επιδράσεις τους στην υγεία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συσχετίζονται με μια σειρά από οφέλη, όπως η μείωση πιθανότητας εμφάνισης του ΣΔ2, η αντιυπερτασική, η αντιβακτηριακή, η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική ικανότητα (2,6,18), η μείωση του σχετικού κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, και η νόσος του Alzheimer (19). Μια σημαντική παράμετρος που αναφέρεται στη σχετική βιβλιογραφία είναι ότι το μίγμα όλων αυτών των συστατικών, και όχι το οποιαδήποτε επιμέρους συστατικό, είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη επίδραση στην υγεία.

Έχει βρεθεί ότι τα χλωρογενικά οξέα φτάνουν στο κόλον σε ποσοστό 70%, όπου και διασπώνται από την τοπική μικροχλωρίδα, δημιουργώντας κυρίως μικρά φαινολικά οξέα και αρωματικούς καταβολίτες που μπορούν να απορροφηθούν από το κυκλοφορικό σύστημα (2). Το υπόλοιπο 30% των προσλαμβανόμενων ενώσεων απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα (20). Η απορρόφηση των CGAs από τον οργανισμό κατά 30% έχει επιβεβαιωθεί και σε άλλες μελέτες (19,21). Μετά την κατάποση του καφέ, τα χλωρογενικά οξέα εμφανίζονται στο πλάσμα υπό τη μορφή μεθυλιωμένων, θειωμένων, και γλυκουρονιδιωμένων μεταβολιτών σε συγκεντρώσεις που της τάξης των nM.

1.1.2.3 Καφεστόλη και καφεόλη

Πρόκειται για διτερπένια με σκελετό καουρενίου που σε συνδυασμό με τα παράγωγά τους αντιπροσωπεύουν το 20% περίπου των λιπιδίων του καφέ (22,23). Ειδικότερα, η περιεκτικότητα του καφέ σε καφεστόλη φτάνει το 0,2-0,6 % του ξηρού βάρους (ενώ η καφεόλη ούσα πιο ευαίσθητη είναι λιγότερο άφθονη). Το είδος *arabica* έχει υψηλότερα επίπεδα διτερπενίων σε σχέση με το *robusta*, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως κατά το φιλτράρισμα του ροφήματος καφέ τα διτερπένια κατακρατώνται στα φίλτρα με αποτέλεσμα να ανευρίσκονται μόνο σε αφιλτράριστα ροφήματα (πχ ελληνικός).

Ως προς την πιθανή βιοδραστικότητα της καφεστόλης και της καφεόλης, σε *in vitro* μελέτες έχουν εμφανίσει αντικαρκινικές ιδιότητες (22,23). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτη και η συσχέτιση που έχει παρατηρηθεί μεταξύ της ποσότητας διτερπενίων με την αύξηση των επιπέδων λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) σε ανθρώπους κάτι που έμμεσα μεταφράζεται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (24).



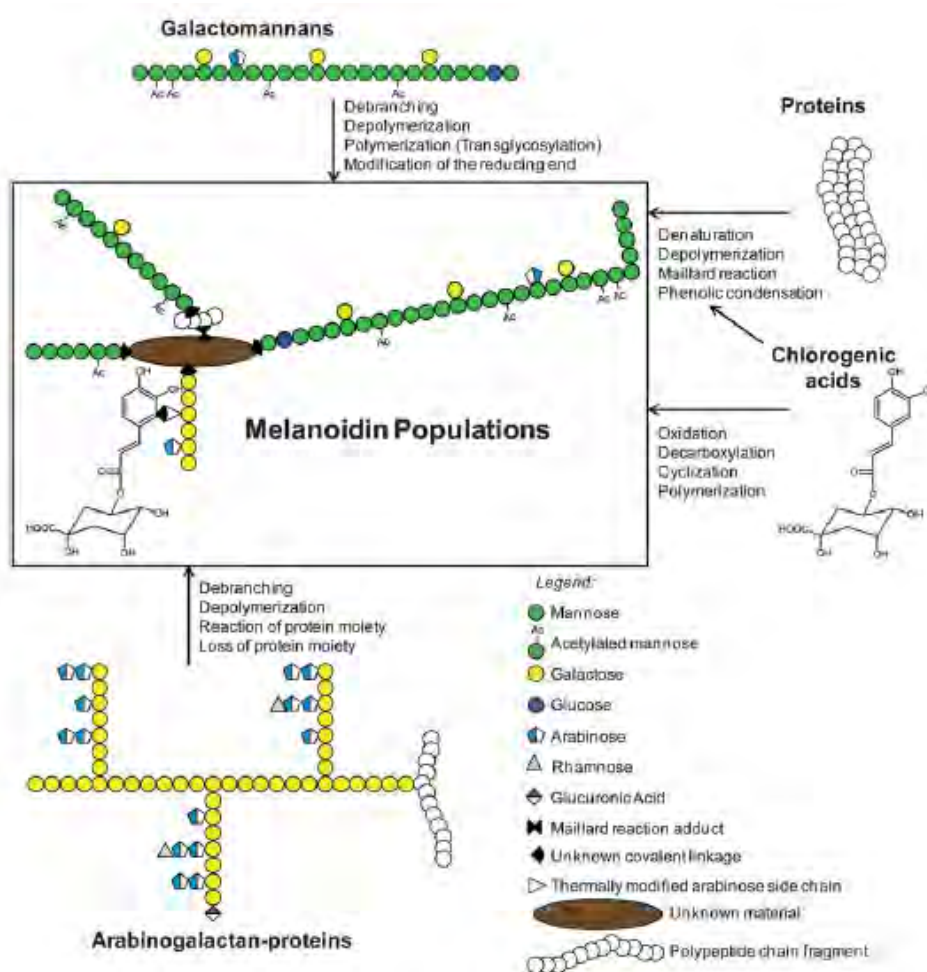
Εικόνα 3: Δομή της καφεστόλης και της καφεόλης

1.1.2.4 Μελανοϊδίνες

Το καβούρδισμα του καφέ επιφέρει πολλές βιοχημικές αλλαγές πέραν της προφανούς στο χρώμα του κόκκου. Η σύσταση μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό καθώς μειώνονται οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα αναγωγικά σάκχαρα, τα χλωρογενικά οξέα και το νερό ενώ προκύπτουν δομικά καινούργια μόρια όπως οι μελανοϊδίνες (25).

Οι μελανοϊδίνες είναι μεγαλομοριακά σύμπλοκα που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων μη ενζυμικής αμαύρωσης Maillard, που λαμβάνουν χώρα κατά την θερμική επεξεργασία (καβούρδισμα) των κόκκων του καφέ (26). Πέρα των μελανοϊδινών, που ευθύνονται για το καφέ χρώμα του καφέ, από τις αντιδράσεις Maillard σχηματίζονται και αρωματικές ενώσεις όπως κάποιες πυριδίνες και πυραζόλια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του χαρακτηριστικού αρώματος του καφέ (5).

Αναλυτικότερα, η συγκεκριμένη αντίδραση μη ενζυμικής αμαύρωσης αποτελείται στην πραγματικότητα από ένα σύνολο αντιδράσεων μεταξύ ενώσεων με μια ελεύθερη αμινομάδα (πχ πρωτεΐνες) και αναγωγικών σακχάρων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κάθε φορά είναι τυχαίες έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ποικιλίας προϊόντων. Οι μελανοΐδινες είναι αζωτούχες ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και καφέ χρώματος. Λόγω του τυχαίου σχηματισμού τους καθίσταται αδύνατη η μελέτη της ακριβούς χημικής δομής τους κι έτσι είναι δύσκολη και η μελέτη της πιθανής βιοδραστικότητάς τους (26). Εκτός των αναγωγικών σακχάρων και πρωτεϊνών, έχει παρατηρηθεί ότι στις μελανοΐδινες ενσωματώνονται και χλωρογενικά οξέα, ωστόσο παραμένει άγνωστο αν αυτό γίνεται μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης ή κάποιας άλλης αλληλεπίδρασης (27). Έχει προταθεί η παρακάτω γενική δομή (Εικόνα 4):



Εικόνα 4: Προτεινόμενη δομή του σκελετού μελανοΐδινών. Από (26).

Εξαιτίας της δυσκολίας πραγματοποίησης δομικών μελετών η μελέτη των μελανοϊδινών γίνεται, συνήθως, έμμεσα μέσω φιλτραρίσματος. Εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύουν ~25% του ξηρού βάρους του καβουρδισμένου καφέ. Ακόμα, το περιεχόμενο σε μελανοϊδίνες μπορεί να μετρηθεί και μέσω της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm (26).

Αναφορικά με την πιθανή βιοδραστικότητα των μελανοϊδινών, *in vitro* μελέτες αναφέρουν ότι εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτή η ικανότητα όμως, πιθανότατα οφείλεται στα χλωρογενικά οξέα που είναι συνδεδεμένα σκελετό (26,28).

1.1.3 Επίδραση του καφέ στην υγεία

Η φυσιολογική κατανάλωση καφέ (3-4 κούπες ημερησίως) έχει συσχετιστεί με ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, νευροεκφυλιστικές νόσοι, ΣΔ2 και στεφανιαία νόσος (5,7,29–33). Εκτός αυτών, ο καφές εμφανίζει και εργογόνες ιδιότητες, γεγονός σημαντικό στον αθλητισμό και ειδικότερα σε ασκήσεις αντίστασης καθώς έχουν παρατηρηθεί βελτιώσεις στην απόδοση έπειτα από κατανάλωση καφέ (6).

Αναλυτικότερα για την κάθε ασθένεια, όσον αφορά τον καρκίνο, έχει παρατηρηθεί μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης καφέ (ακόμα και μόνο 1 κούπα ημερησίως) και της συχνότητας εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου (ήπατος, ενδομητρίου, στοματοφαρυγγικού, παχέος εντέρου) (34). Αυτή η συσχέτιση πιθανότατα οφείλεται στα βιοδραστικά συστατικά του καφέ όπως τα χλωρογενικά οξέα, η καφεΐνη ή τα διτερπένια. Ωστόσο, τα αποτελέσματα πολλές φορές είναι αντικρουόμενα ή δεν δείχνουν κάποια επίδραση κι έτσι επί του παρόντος δεν υπάρχει κάποια ειδική σύσταση σχετικά με την κατανάλωση καφέ στις διατροφικές κατευθυντήριες γραμμές (7).

Ως προς τον σακχαρώδη διαβήτη, κάθε κούπα καφέ μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης κατά 7% και σύμφωνα με μία πρόσφατη ανασκόπηση, η κατανάλωση καφέ έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκκριση ινσουλίνης και μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη (30). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης παραμένει άγνωστος, ωστόσο έχει φανεί ότι τόσο η καφεΐνη όσο και τα χλωρογενικά οξέα συνεισφέρουν. Ειδικά τα τελευταία έχουν αντι-υπεργλυκαιμική δράση, αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνοντας τη δραστηριότητα του συμμεταφορέα γλυκόζης/νατρίου στο έντερο (30).

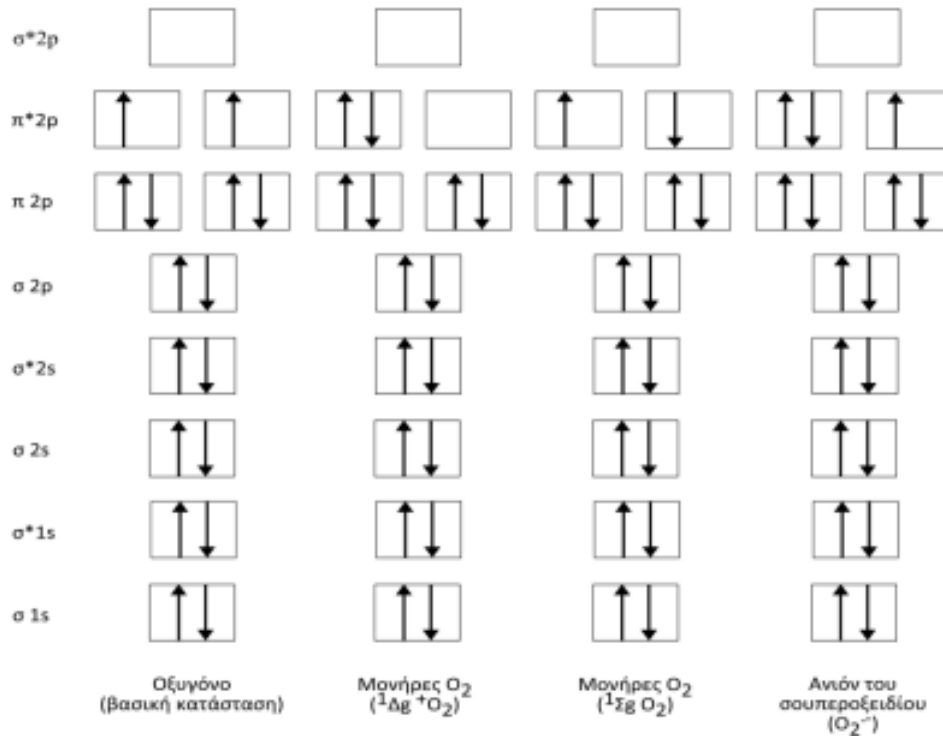
Οι ευεργετικές ιδιότητες του καφέ έχουν αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητές του. Είναι χαρακτηριστικό πως ο καφές εμφανίζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση

in vitro, συγκριτικά με τα υπόλοιπα συχνά καταναλισκόμενα ροφήματα. Επιπρόσθετα, στη δυτική διατροφή η συμβολή του στην πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών προσεγγίζει έως και το 70%. Οι κύριες αντιοξειδωτικές ενώσεις του καφέ είναι οι πολυφαινόλες, και δη τα χλωρογενικά οξέα, ενώ εν μέρει συμβάλλουν οι μελανοϊδίνες και πτητικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που σχηματίζονται κατά το καβούρδισμα (28). Αξίζει να σημειωθεί πως παλιότερες μελέτες ανέφεραν πιθανή μεταλλαξιγόνο δραστηριότητα του καφέ, αν και είναι αναγκαίο να αναφερθεί πως χρησιμοποιήθηκαν είτε υπερβολικά καβουρδισμένα δείγματα ή πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις καφέ (35–37).

Γενικά, ο καφές εμφανίζει ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως έχει δειχθεί σε αρκετές δημοσιευμένες εργασίες. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν είναι αποσαφηνισμένος. Οι μελέτες σε ανθρώπους βασίζονται κυρίως σε παρατηρήσεις (observational) ενώ στα ζώα σπανίως μελετώνται οι επιδράσεις του σε περισσότερους των 2 ιστών. Γι' αυτό το λόγο η παρούσα διατριβή είχε ως στόχο την μελέτη του μηχανισμού δράσης ενός επιλεγμένου δείγματος καφέ σε διάφορους ιστούς.

1.2 Ελεύθερες ρίζες

Σύμφωνα με τον ορισμό, ελεύθερη ρίζα «θεωρείται κάθε μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους» (38–40) (Εικόνα 5). Πρόκειται για πολύ ασταθή μόρια (έχουν εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής) διότι τείνουν να αποσπασούν e^- από τα βιομόρια (πχ DNA, λιπίδια ή πρωτεΐνες) για να συμπληρώσουν τη στιβάδα σθένους τους (39,41). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια στόχοι να μετατρέπονται τα ίδια σε ρίζες, οδηγώντας έτσι στην έναρξη μίας αλυσιδωτής αντίδρασης με τελικό αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (39).

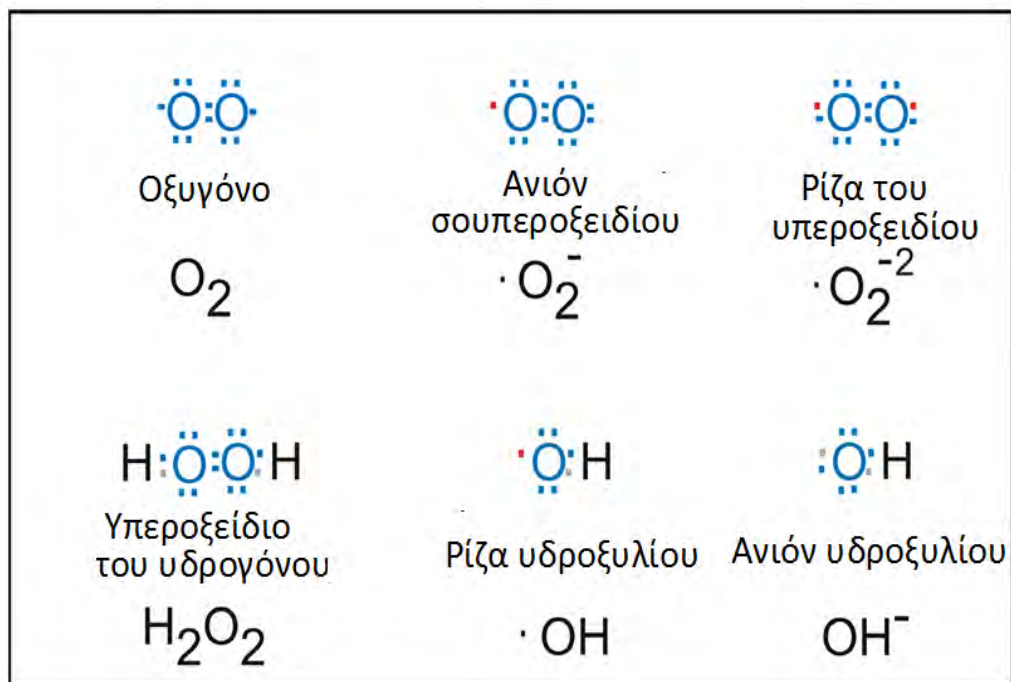


Εικόνα 5: Απεικόνιση των δεσμών και της ηλεκτρονιακής στροφορμής στις διάφορες μορφές του διατομικού μορίου του οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες είναι φυσιολογικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού ενώ μπορούν να παραχθούν και ως συνέπεια άλλων κυτταρικών διεργασιών (πχ δράση ανοσοποιητικού συστήματος) ή εξωτερικών παραγόντων (άσκηση, έκθεση σε τοξικούς παράγοντες) (42).

Οι ελεύθερες ρίζες που έχουν το οξυγόνο ως κεντρικό άτομο αναφέρονται ως Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υδροξυλίου (HO^{\cdot}). Στις ROS όμως ανήκουν και μη ριζικά παράγωγα, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Εικόνα 6).

Εκτός του οξυγόνου, υπάρχουν και ελεύθερες ρίζες με άλλα κεντρικά άτομα, όπως το άζωτο, έχοντας πάντως παρεμφερή τρόπο δράσης. Κατ' αντιστοιχία, ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS) με χαρακτηριστικά παραδείγματα το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot}) (43,44).

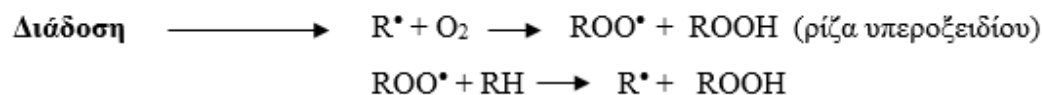


Εικόνα 6: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών

Η δράση τους μπορεί να χωριστεί σε τρία διακριτά στάδια: η έναρξη, η διάδοση και ο τερματισμός. Αρχικά, μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να παραχθεί μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου, μια αντίδραση που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (45). Έπειτα, στο στάδιο της διάδοσης, μια νέα ρίζα μπορεί να παραχθεί λόγω αλληλεπίδρασης της σχηματιζόμενης ρίζας με ένα ουδέτερο μόριο.

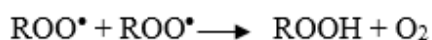
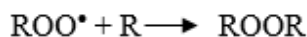
Έναρξη ενέργεια R^* (ελεύθερη ρίζα)



Τερματισμός



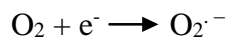
(αδρανή προϊόντα που δε προκαλούν έναρξη ή διάδοση)



1.3 Είδη Ελευθέρων Ριζών

1.3.1 Ανιόν σουπεροξειδίου (Σουπεροξειδίο)

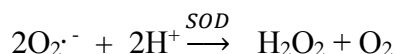
Το σουπεροξειδίο προέρχεται από το οξυγόνο έπειτα από αναγωγή του με ένα ηλεκτρόνιο:



Η παραγωγή του οφείλεται κυρίως στην ατελή αναγωγή του οξυγόνου σε νερό κατά τη διάρκεια της αναπνευστικής αλυσίδας που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το σουπεροξειδίο είναι αρνητικά φορτισμένο και ως εκ τούτου δεν δύναται να διαπεράσει τη μεμβράνη (Halliwell and Gutteridge, 2015). Πέραν της αναπνευστικής αλυσίδας, το σουπεροξειδίο μπορεί να παραχθεί και από τη δραστικότητα ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η NADPH οξειδάση, η κυκλοξυγενάση και η λιποξυγενάση. Ειδικότερα όσον αφορά την NADPH οξειδάση, παράγονται μεγάλες ποσότητες σουπεροξειδίου σε κατάσταση φλεγμονής ως αντίδραση του οργανισμού στην εισβολή μικροοργανισμών, μια διαδικασία γνωστή και ως «αναπνευστική έκρηξη» (46).

1.3.2 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

Αποτελεί μια εν δυνάμει ρίζα, καθώς δεν εμφανίζει δραστικότητα *per se*, ωστόσο μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή της ρίζας του υδροξυλίου. Μπορεί να σχηματιστεί μέσω της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD), όπως φαίνεται παρακάτω (47):



Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί σχηματισμού του υπεροξειδίου, μεταξύ των οποίων η καταλυτική δράση οξειδασών (πχ η οξειδάση της γλυκόζης) που χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα μεταφέροντάς του ηλεκτρόνια. Το υπεροξειδίο είναι σταθερό (έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με τις υπόλοιπες ROS) και μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη λόγω έλλειψης φορτίου. Η κυτταροτοξικότητα του σχετίζεται με την συμμετοχή του στην αντίδραση Fenton παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, δίνοντας την παρακάτω αντίδραση:



1.3.3 Ρίζα Υδροξυλίου (HO·)

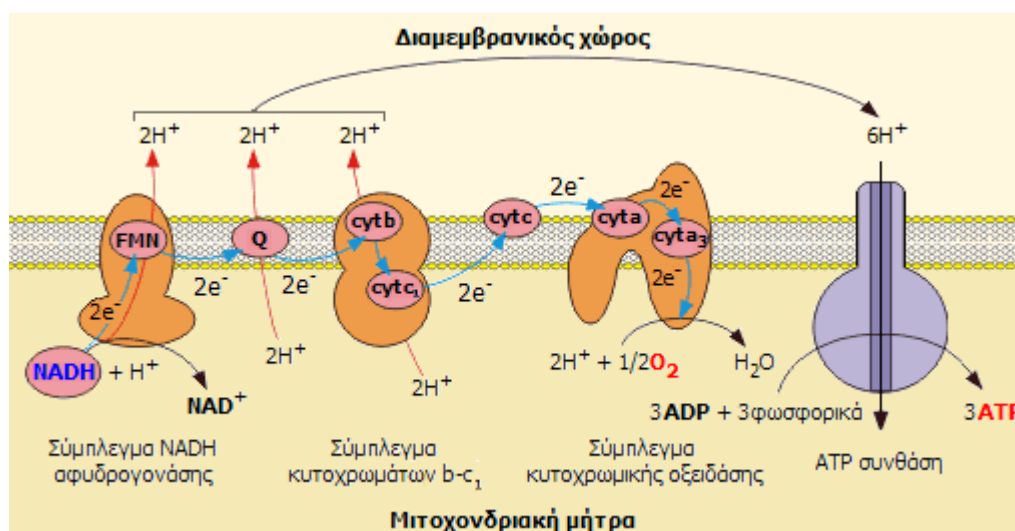
Πρόκειται για την πλέον δραστική ελεύθερη ρίζα λόγω του ελάχιστου χρόνου ημιζωής της (48,49). Όπως φάνηκε και παραπάνω, παράγεται από την αντίδραση Fenton μέσω της

αλληλεπίδρασης ενός μετάλλου μετάπτωσης το οποίο δρα καταλυτικά (όπως ο δισθενής σίδηρος ή ο μονοσθενής χαλκός) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (39). Η συγκεκριμένη ρίζα είναι εξαιρετικά δραστική, αλληλεπιδρώντας με οποιοδήποτε κυτταρικό μακρομόριο (DNA, πρωτεΐνες ή/και λιπίδια) βρεθεί πλησίον της, προκαλώντας έτσι οξειδωτικές βλάβες (42).

1.4 Παραγωγή ελευθέρων ριζών από ενδογενείς πηγές

1.4.1 Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και δη των ROS είναι μια φυσική συνέπεια του μεταβολισμού όλων των αερόβιων οργανισμών. Αναλυτικότερα, ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς είναι η ατελής αναγωγή το οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανιόντος του σουπεροξειδίου όπως προαναφέρθηκε (50). Οι αερόβιοι οργανισμοί στηρίζονται σε μεγάλο βαθμό στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας. Η συγκεκριμένη διαδικασία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου δημιουργείται μια διαβάθμιση πρωτονίων εν μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από μόρια όπως το NADH με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Αναπνευστική αλυσίδα

Η γλυκόλυση καθώς και ο κύκλος του κιτρικού οξέος έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων NADH (ή/και FADH₂) τα οποία έχουν επιφορτιστεί με ένα ζεύγος e⁻ υψηλού δυναμικού μεταφοράς. Τα ηλεκτρόνια αυτά παραλαμβάνονται από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής

μιτοχονδριακής μεμβράνης, τα οποία με τη σειρά τους ανάγουν το οξυγόνο σε νερό. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία είναι ατελής, με αποτέλεσμα ένα μέρος του οξυγόνου να ανάγεται προς $O_2^{\cdot-}$ (51).

1.4.2 Δράση οξειδάσης της ξανθίνης (XO)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η XO φυσιολογικά απαντάται σε πολύ χαμηλά επίπεδα καθώς η κύρια μορφή είναι η αφυδρογονάση της ξανθίνης. Όταν η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ καταλύεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης δεν παράγονται δραστικές μορφές. Ωστόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ως αποτέλεσμα κάποιας παθολογικής κατάστασης ή έντονης άσκησης) η αφυδρογονάση πρωτεολύεται μερικώς και σαν αποτέλεσμα δημιουργείται η οξειδάση της ξανθίνης. Κατά την ισχαιμία η οξυγόνωση μειώνεται σε πολύ σημαντικό βαθμό, ωστόσο με την αποκατάσταση της κυκλοφορίας (επαναιμάτωση) το οξυγόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την οξειδάση η οποία ναι μεν παράγει το ουρικό οξύ (ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος) αλλά ταυτόχρονα οδηγεί και στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ως παραπροϊόντα λόγω διαφοράς στον μηχανισμό κατάλυσης της (ρίζα σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου) (52–54)(Εικόνα 8). Η XO είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο, αλλά μπορεί να εντοπιστεί και στην κυκλοφορία, εκεί όπου εμφανίζει την ικανότητα προσκόλλησης στα τοιχώματα των αγγείων και δη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας τοπική αύξηση παραγωγής ROS (γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με καρδιαγγειακές παθήσεις (55).



Εικόνα 8: Μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών από την οξειδάση της ξανθίνης

1.4.3 Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι ακόμα ένας μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αναλυτικότερα, η φλεγμονώδης απόκριση έπειτα από την εισβολή κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού έχει σαν αποτέλεσμα την προσέλκυση μακροφάγων. Αυτά τα κύτταρα έχουν μια μεμβρανική πρωτεΐνη, την NADPH οξειδάση, η οποία ενεργοποιείται και παράγει δραστικές

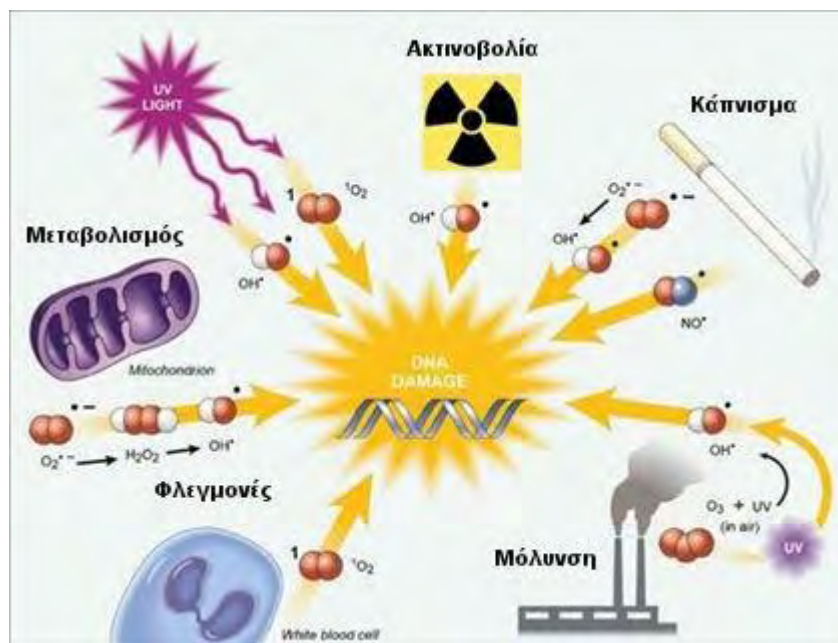
μορφές οξυγόνου με απώτερο σκοπό την καταστροφή των εισερχόμενων μικροοργανισμών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί έναν από τους πυλώνες της έμφυτης άμυνας του οργανισμού. (56).

1.4.4 Άλλες πηγές

Εκτός των προαναφερθεισών, υπάρχουν και άλλες πηγές που συνεισφέρουν σε ποικίλο βαθμό στην παραγωγή δραστικών μορφών. Αναφορικά, στα υπεροξεισωμάτια πραγματοποιείται η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο συμβάλλει σε μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα συγκεκριμένα οργανίδια (57). Ακόμα, τα ένζυμα P450 (οξειδάσες που συμμετέχουν σε αντιδράσεις του μεταβολισμού ξενοβιοτικών φάσης I) παράγουν ελεύθερες ρίζες (58). Αναλυτικότερα, μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NAD(P)H στο οξυγόνο, οξειδώνοντας παράλληλα το υπόστρωμά τους. Κατα αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στην αδρανοποίηση και απομάκρυνση ξενοβιοτικών ουσιών αυξάνοντας την πολικότητα τους, αν και σε πολλές περιπτώσεις μπορούν να μετατρέψουν μια αρχικά αδρανή μορφή σε τοξική ή καρκινογόνο (πχ βενζοπυρένιο).

1.5 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εκτός των ενδογενών πηγών, η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να προκληθεί και από εξωγενείς πηγές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, έκθεση στην οποία μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένες βλάβες στο δέρμα και τα μάτια. Επιπρόσθετα, το κάπνισμα, το αλκοόλ, στο στρες και η επαφή με ξενοβιοτικές ουσίες, όπως τα απόβλητα βιομηχανιών, τα φυτοφάρμακα ή/και τα εντομοκτόνα μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ελευθέρων ριζών (42) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Παραγωγή ελευθέρων ριζών

1.6 Βιολογικές δράσεις των δραστικών μορφών

Οι δραστικές μορφές θεωρούνται βλαβερά μόρια, ωστόσο συμμετέχουν σε μια πλειάδα φυσιολογικών οξειδοαναγωγικών διεργασιών του οργανισμού. Αναλυτικότερα, έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί ώστε ένας αερόβιος οργανισμός να εκμεταλλεύεται τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες στη μεταγωγή σήματος, τον πολλαπλασιασμό, την αναδίπλωση των αρτιγενών πρωτεϊνών και τέλος στο ανοσοποιητικό σύστημα (βλέπε [1.4.3](#)). Κατά αυτόν τον τρόπο, συνεισφέρουν στην ομοίωση τόσο των κυττάρων όσο και ολόκληρου του οργανισμού.

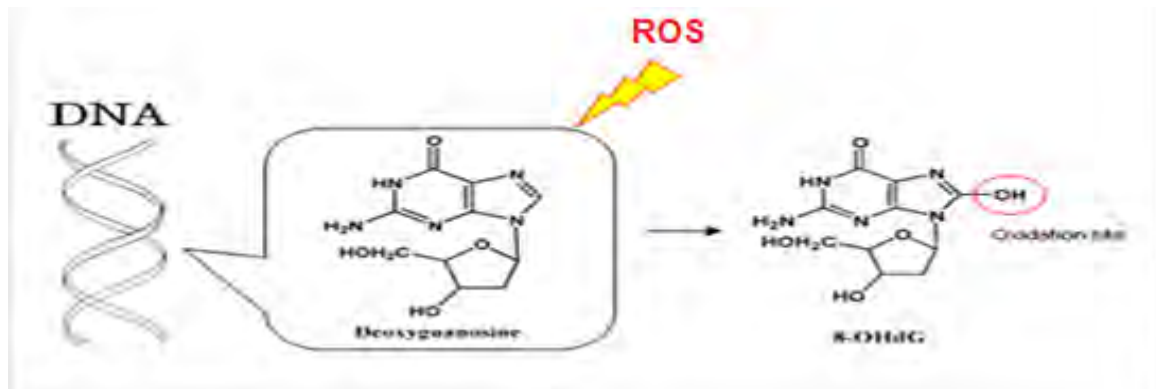
Αξίζει να σημειωθεί πως η αλληλεπίδραση ενός οργανισμού με τις ελεύθερες ρίζες διέπεται από το φαινόμενο της όρμησης (hormesis). Σύμφωνα με αυτό, ένα ερέθισμα σε χαμηλή συγκέντρωση έχει ευεργετική επίδραση. Όταν όμως η συγκέντρωση υπερβεί μια ουδό τότε οδηγούμαστε σε πρόκληση βλαβών σε βιομόρια (59).

Αναφορικά με τις βλαβερές συνέπειες των δραστικών μορφών όταν αυτές βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (ή όταν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού δεν επαρκούν), μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κυτταρικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και το DNA) αλλοιώνοντάς ή καταστρέφοντάς τα. Οι δραστικές μορφές και εν γένει το χρόνια οξειδωτικό στρες (η κατάσταση δηλαδή στην οποία τα οξειδωτικά μόρια υπερέχουν των αντιοξειδωτικών) έχουν συσχετιστεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές ασθένειες, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και η γήρανση (60–64).

Αναλυτικότερα για κάθε κυτταρικό μακρομόριο, τα λιπίδια είναι περισσότερο ευάλωτα στην οξείδωση. Η αλληλεπίδραση ελευθέρων ριζών με τα λιπίδια των μεμβρανών σχηματίζει τα άκρως ενεργά και ασταθή υπεροξειδία των λιπιδίων, τα οποία με τη σειρά τους διασπώνται δίνοντας ρίζες περοξυλίου (ROO·) και μηλονική διαλδεύδη (MDA). Επομένως, η οξείδωση των λιπιδίων προκαλεί αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητας με συχνό επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, η οξείδωσή τους οδηγεί στο σχηματισμό των αντίστοιχων καρβονυλίων (65). Τα τέσσερα κύρια αμινοξέα που καρβονυλιώνονται είναι η προλίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη (66,67). Η καρβονυλίωση είναι μη αναστρέψιμη και οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως ο μέτριος βαθμός καρβονυλίωσης επιτρέπει τη διάσπαση από το πρωτεάσωμα, ωστόσο οι έντονα καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες δεν δύνανται να διασπαστούν και συσσωματώνονται (65,67).

Επιπρόσθετα, το DNA μπορεί επίσης να αποτελέσει στόχο ελευθέρων ριζών, οδηγώντας σε αλλοίωση των βάσεων, ρήξεις και εν τέλει μεταλλάξεις. Αυτό μπορεί να προκύψει και έμμεσα μέσω οξείδωσης των πρωτεϊνών του συστήματος επιδιόρθωσης (68) (Εικόνα 11).



Εικόνα 10: Αλληλεπίδραση της γουανίνης του DNA με ROS που οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυδιογουανοσίνης (8-OHdG).

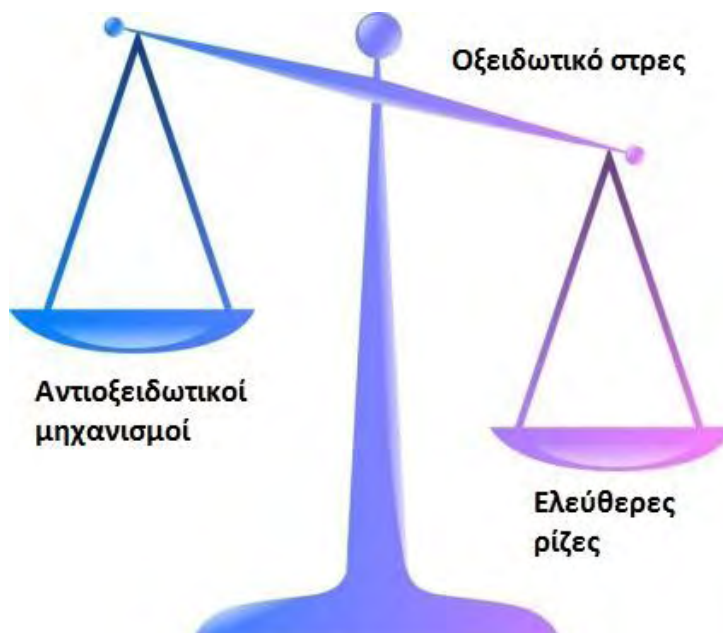
1.7 Οξειδωτικό στρες

Σαν όρος το οξειδωτικό στρες αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Sies το 1985 και προσδιορίζει μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων (69). Ανέκαθεν το οξειδωτικό στρες θεωρούνταν ένα επιβλαβές φαινόμενο για τον οργανισμό, καθώς έχει συσχετιστεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν συσσωρευτεί μελέτες που υποστηρίζουν πως το οξειδωτικό

στρες προκύπτει και φυσιολογικά στον οργανισμό παροδικά, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης (59,69). Χαρακτηριστικά, η παρουσία οξειδωτικού στρες σε ένα κύτταρο μπορεί να προκαλέσει επαγωγή της αυτοφαγίας, μιας διαδικασίας που ευθύνεται για την ανακύκλωση κυτταρικών μακρομορίων που έχουν υποστεί βλάβες και μεταξύ άλλων μπορεί να προκαλέσει επαγωγή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου (70). Σε περιπτώσεις που το οξειδωτικό στρες είναι παρατεταμένο μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένες βλάβες με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης (46). Αξίζει να σημειωθεί πως οι ήπιες βλάβες στο DNA που προκαλούν μεταλλάξεις αλλά όχι τόσο εκτεταμένες για να οδηγηθεί το κύτταρο σε θάνατο είναι οι πλέον επικίνδυνες ως προς τον κίνδυνο καρκινογένεσης (71).

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός κυττάρου παρουσιάζεται ως μια ζυγαριά μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μορίων. Οξειδωτικό στρες υφίσταται όταν γέρνει η ισορροπία υπέρ των πρώτων, το οποίο οφείλεται σε μια εκ των δυο συνθηκών:

- Μείωση στα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε μέσω κάποιας μετάλλαξης, είτε λόγω απουσίας κάποιου συμπαραγόντα, ή μέσω εξάντλησης αντιοξειδωτικών μορίων που λαμβάνονται από τη διατροφή.
- Αύξηση παραγωγής ROS ή RNS είτε λόγω έκθεσης σε κάποιο τοξικό εξωγενή παράγοντα είτε μέσω των ενδογενών μηχανισμών (πχ άσκηση ή φλεγμονή).



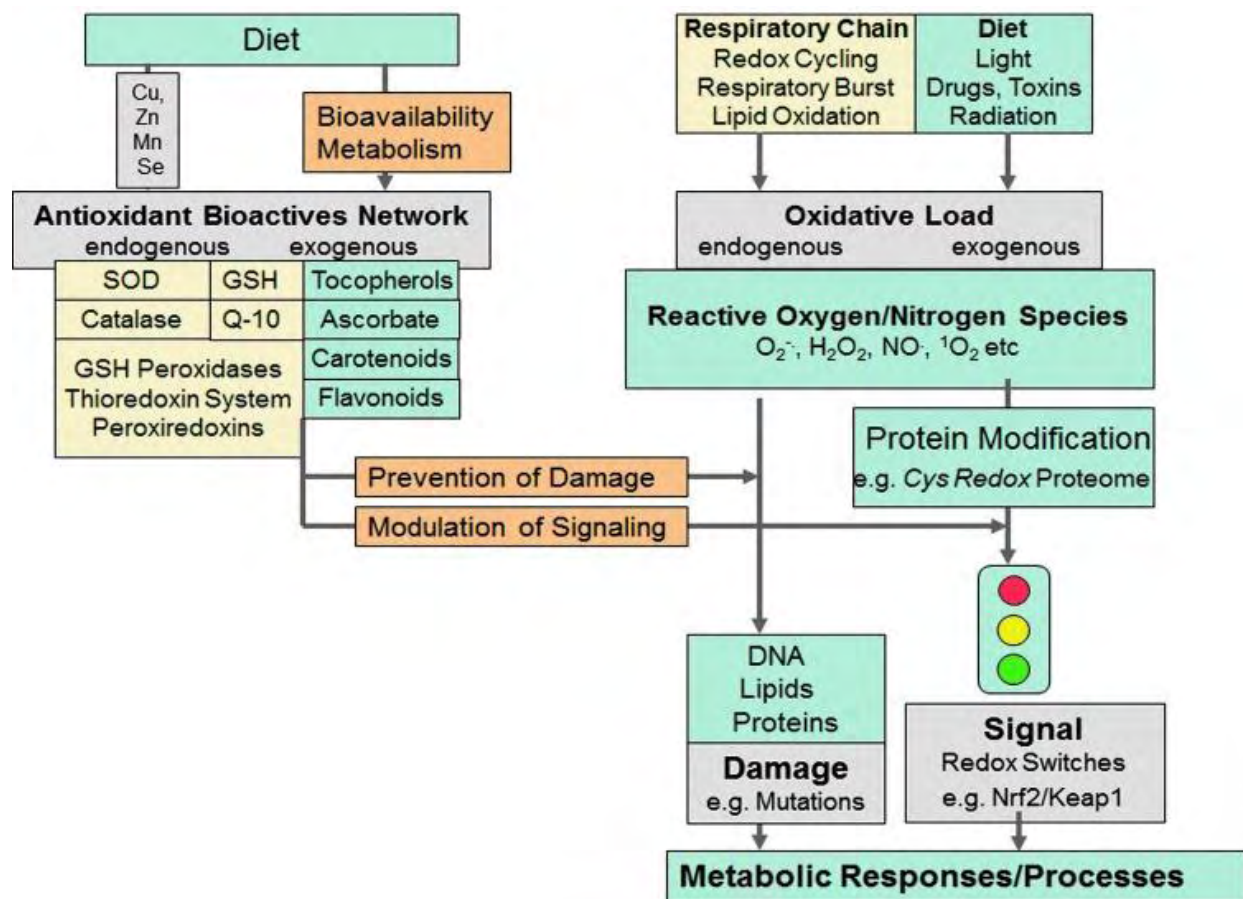
Εικόνα 11: Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας

1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Καθώς ένας αερόβιος οργανισμός παράγει συνεχώς ελεύθερες ρίζες, εξελικτικά ανέπτυξε διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ώστε να προλαμβάνει ή/και να επιδιορθώνει τις οξειδωτικές βλάβες. Σύμφωνα με τον ορισμό, «Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού» (42).

Το σύνολο των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός κυττάρου αποσκοπεί στην ελαχιστοποίηση των οξειδωτικών βλαβών που μπορούν να προκληθούν από τις ελεύθερες ρίζες και συνολικά η διατήρηση της ομοιόστασης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (72). Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η διατήρηση βασικών επιπέδων ελευθέρων ριζών ώστε να διατηρηθούν και τα οξειδοαναγωγικά σηματοδοτικά μονοπάτια, επομένως οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί πρέπει να εξουδετερώνουν μόνο την περίσσεια των παραγόμενων οξειδωτικών μορίων (Εικόνα 12) (73).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, αναλόγως του αν είναι ένζυμα ή όχι. Τα ενζυμικά είναι αμιγώς ενδογενή ενώ στα δεύτερα πέρα των ενδογενών συμπεριλαμβάνονται και αυτά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Ένα μόριο θεωρείται αντιοξειδωτικό όταν αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες σχηματίζοντας λιγότερο αντιδραστικά προϊόντα από τα αρχικά μόρια. Στα αντιοξειδωτικά ένζυμα συμπεριλαμβάνονται οι ισομορφές της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), η καταλάση (CAT), η θειορεδοξίνη (Txn), η οξυγενάση της αίμης (HO-1), η NADPH αφυδρογονάση των κινονών (NQO1), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) και οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) μεταξύ άλλων. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά, ναφέρονται ενδεικτικά οι βιταμίνες A (ρετινόλη), C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλη), οι θειόλες (γλουταθειόνη), οι πολυφαινόλες, το ουρικό οξύ, η φερριτίνη, η χολερυθρίνη καθώς και κάποια χημικά στοιχεία που είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες σε ορισμένα από τα ανωτέρω ένζυμα (σελήνιο, ψευδάργυρος, σίδηρος, χαλκός και μαγνήσιο).

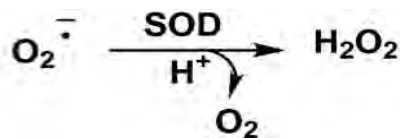


Εικόνα 12: Σύνοψη της αλληλεπίδρασης ενδογενών/εξωγενών αντιοξειδωτικών με τα οξειδωτικά μόρια. Το σύνολο των αντιοξειδωτικών μορίων ενός οργανισμού (είτε αυτά προέρχονται από τη διατροφή είτε είναι ενδογενή) αλληλεπιδρούν με το σύνολο των οξειδωτικών μορίων που παράγονται, επηρεάζοντας έτσι την επίδραση των τελευταίων στον οργανισμό. Η επίδραση αυτή καθορίζεται από τη συγκέντρωση των οξειδωτικών και αφορά είτε θετικές επιδράσεις (πχ σηματοδότηση) είτε βλαβερές (οξείδωση μακρομορίων). Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/First-formulation-of-the-concept-of-oxidative-stress-Shown-here-is-a-contemporary_fig3_259559513.

1.8.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

1.8.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) σε O_2 και H_2O_2 όπως φαίνεται και παρακάτω:



Υπάρχουν τρεις ισομορφές της δισμουτάσης, μια κυτταροπλασματική (Cu-Zn SOD1, διμερής), μια μιτοχονδριακή (Fe-Mn SOD2, τετραμερής) και μια εξωκυτταρική (SOD3,

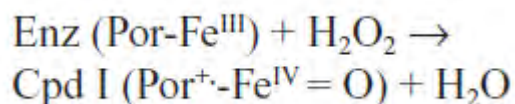
τετραμερής (74,75). Η SOD θεωρείται απαραίτητο ένζυμο για την επιβίωση σχεδόν όλων των αερόβιων οργανισμών καθώς είναι η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού.

1.8.1.2 Καταλάση (CAT)

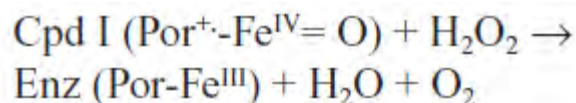
Η καταλάση είναι μια τετραμερής αιμοπρωτεΐνη και θεωρείται ο «απόλυτος καταλύτης» καθώς μπορεί να μετατρέψει τεράστια ποσότητα μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό ανά δευτερόλεπτο. Εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα και συμβάλλει στην προστασία του οργανισμού από τις εν δυνάμει βλαπτικές συνέπειες του H₂O₂ (76).



Ο μηχανισμός κατάλυσης χωρίζεται σε δυο επιμέρους αντιδράσεις. Στην πρώτη ο τρισθενής σίδηρος (Fe³⁺) της αίμης προκαλεί την αναγωγή ενός μορίου H₂O₂ σε H₂O ενώ ταυτόχρονα παράγεται Fe⁴⁺=O (Cpd I).



Εν συνεχεία, το Cpd I προκαλεί την οξείδωση του H₂O₂ σε O₂, ενώ το ίδιο μετατρέπεται σε H₂O.



Συνολικά παράγονται δυο μόρια H₂O και ένα O₂ (76).

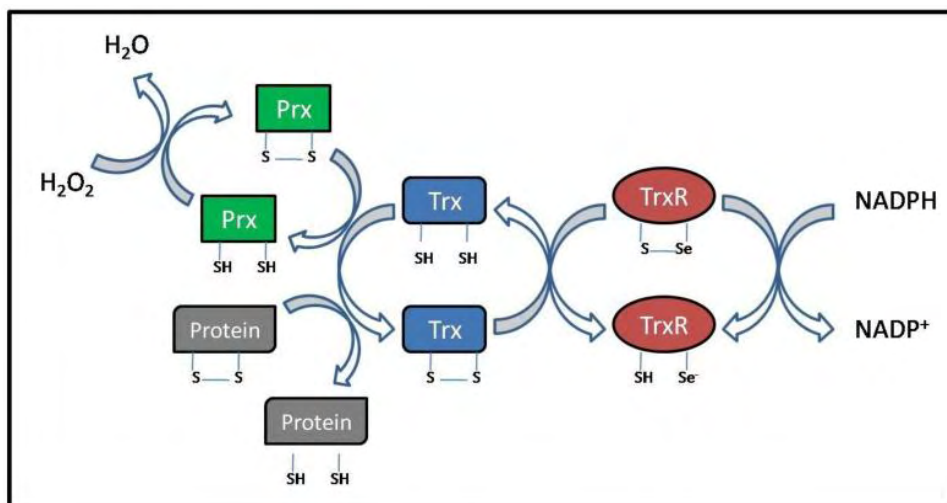
1.8.1.3 Θειορεδοξίνη (Txn)

Πρόκειται για μία αναγωγάση μικρού μοριακού βάρους που μεταφέρει ηλεκτρόνια σε πρωτεΐνες. Η θειορεδοξίνη καταλύει την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών χρησιμοποιώντας το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων (77).

Το αμινοξύ κυστεΐνη αποτελεί έναν αισθητήρα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός κυττάρου λόγω της σουλφιδρυλικής του ομάδας που μπορεί να αλληλεπιδράσει με οξειδωτικά μόρια. Ειδικά οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες περιέχουν πληθώρα ελεύθερων σουλφιδρυλικών ομάδων (στην ανηγμένη τους μορφή δηλαδή) σε αντίθεση με τις εξωκυτταρικές, οι κυστεΐνες των οποίων αντανακλούν το οξειδωτικό περιβάλλον και βρίσκονται στην οξειδωμένη του μορφή

(δισουλφιδικός δεσμός). Η θειορεδοξίνη διατηρεί της κυστεΐνες στην ανηγμένη διαμόρφωση, όντας ένας από τους κύριους μηχανισμούς ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Εικόνα 13) (78).

Η καταλυτική ικανότητα της Trx οφείλεται στο μοτίβο Cys-Gly-Pro-Cys του ενεργού της κέντρου (79). Οι δυο κυστεΐνες είναι απαραίτητες για την κατάλυση ενώ τα υπόλοιπα δύο αμινοξέα δημιουργούν το κατάλληλο θερμοδυναμικό περιβάλλον στο ενεργό κέντρο (80).

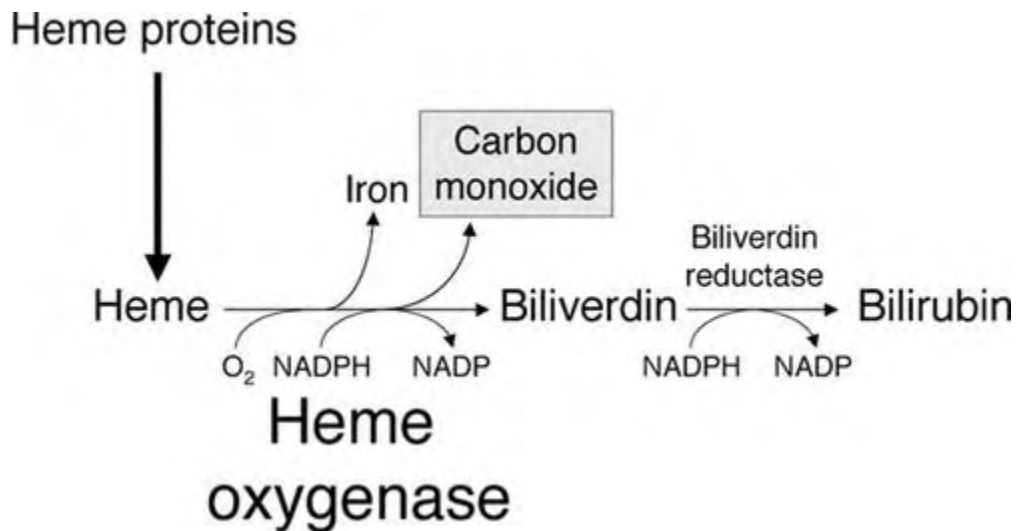


Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης της Trx

Ο καταλυτικός μηχανισμός της θειορεδοξίνης περιλαμβάνει κύκλους αναγωγής και οξείδωσης μεταξύ των κυστεϊνών της θειορεδοξίνης και των υποστρωμάτων της (πχ οι περοξειρεδοξίνες). Όταν οξειδωθεί, η θειορεδοξίνη μπορεί να ανακυκλωθεί από την αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR) και να επανέλθει έτσι στην αρχική της ανηγμένη μορφή (81).

1.8.1.4 Οξυγενάση της αίμης (HO-1)

Η HO-1 συμμετέχει στον καταβολισμό της αίμης (82). Ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας της HO-1 οφείλεται στην χολοπρασίνη και κατ' επέκταση την χολερυθρίνη, δυο ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια που αποτελούν τα τελικά προϊόντα του καταβολισμού της αίμης (Εικόνα 14) (82).

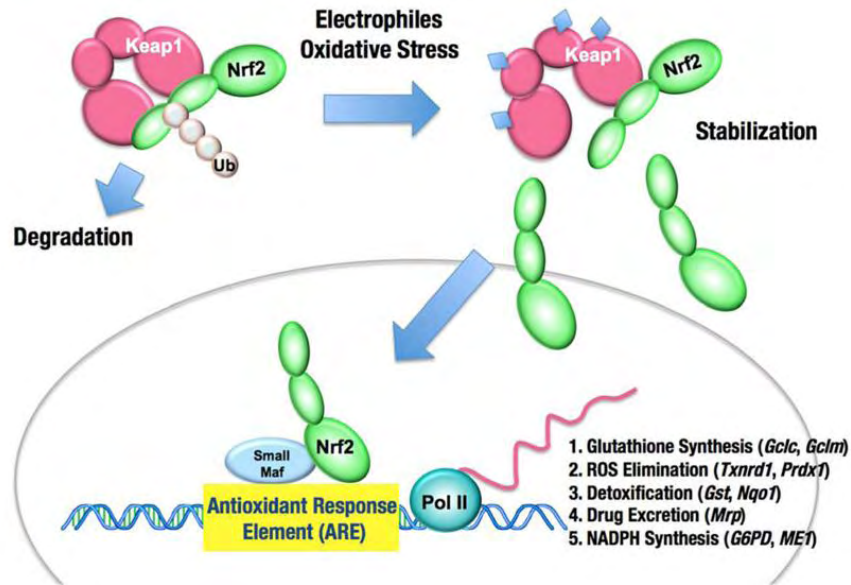


Εικόνα 14: Καταβολισμός της αίμης

Αξίζει να σημειωθεί πως ο δισθενής σίδηρος που παράγεται μπορεί να συμμετάσχει σε αντιδράσεις Fenton οδηγώντας σε παραγωγή ελευθέρων ριζών, ωστόσο παρατηρείται ταυτόχρονη επαγωγή έκφρασης της φερριτίνης, που δρα ως αποθήκη σιδήρου, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα (83). Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει αυξημένη συγκέντρωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο ιστών που είναι υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως είναι ο σπλήνας (84). Εκτός της αίμης, η HO-1 μπορεί να επαχθεί και από άλλους παράγοντες όπως βαρέα μέταλλα, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, κυτταροκίνες και προσταγλανδίνες.

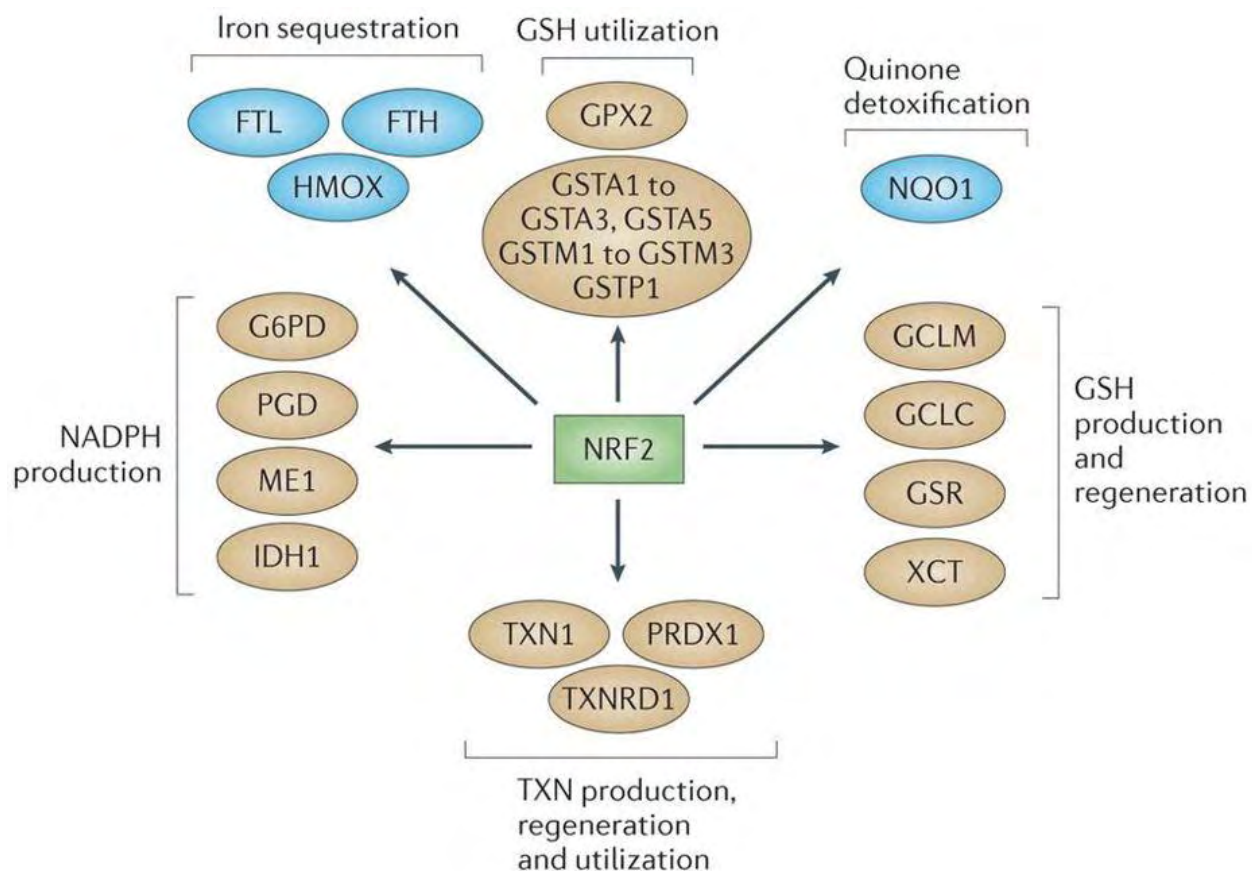
1.8.1.5 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2)

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 δεν έχει άμεση αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο ρυθμίζει την έκφραση πληθώρας αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ανήκει στην κατηγορία φερμουάρ λευκίνης και είναι καθοριστικός στην απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες (85).



Εικόνα 15: Ρύθμιση του Nrf2. Πηγή: (85)

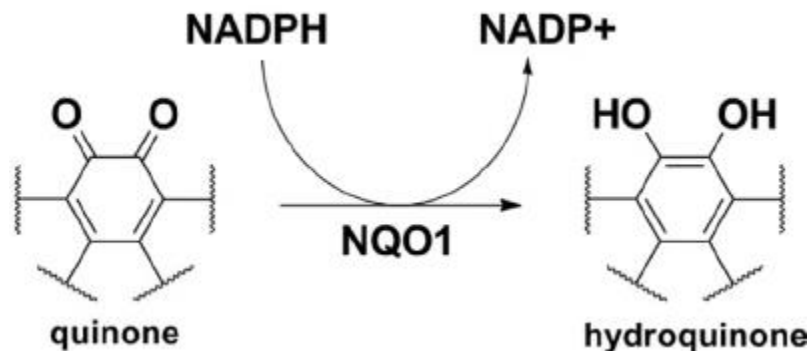
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συντριπτική πλειοψηφία των μορίων Nrf2 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Αυτή η σύνδεση επάγει την ουβικιτινίωση και εν τέλει την αποικοδόμηση του Nrf2 από το πρωτεάσωμα (86). Ωστόσο, η Keap1 έχει την ιδιαιτερότητα να περιέχει ασυνήθιστα υψηλό αριθμό κυστεϊνών (η ανθρώπινη πρωτεΐνη έχει 27 κατάλοιπα), οι οποίες την καθιστούν ιδανικό «αισθητήρα» παρουσίας ηλεκτρόφιλου στρες (όπως αυτό που προκαλείται από την περίσσεια ελευθέρων ριζών) (87). Κατα αυτό τον τρόπο, μια μεταβολή υπέρ των οξειδωτικών καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτες τις κυστεΐνες σε οξείδωση, γεγονός που αποσταθεροποιεί τη σύνδεση Nrf2/Keap1 απελευθερώνοντας τον πρώτο που με τη σειρά του μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με τις μικρές Maf πρωτεΐνες και αλληλεπιδρά με τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία AREs (Antioxidant Response Elements) του DNA, ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων μεταξύ άλλων (Εικόνα 15) (85,88). Έτσι λοιπόν, ο ασυνήθιστα υψηλός αριθμός κυστεϊνών της Keap1 την καθιστά έναν εξαιρετικά ευαίσθητο αισθητήρα ακόμα και μικρών αλλαγών στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, ούτως ώστε να ενεργοποιούνται έγκαιρα οι κυτταροπροστατευτικοί μηχανισμοί και να αποφευχθούν οι κυτταρικές βλάβες (85). Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του Nrf2, κάποια ενέχονται στη βιοσύνθεση και ανακύκλωση της ανηγμένης γλουταθειόνης, στην αδρανοποίηση των ROS, στην αποθήκευση σιδήρου και τον μεταβολισμό ξενοβιοτικών (Εικόνα 16) (89,90).



Εικόνα 16: Γονίδια-στόχοι του Nrf2. Πηγή: (89).

1.8.1.6 NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (NQO1)

Το συγκεκριμένο ένζυμο είναι ομοδιμερές, κυτταροπλασματικό και ανάγει ενδογενείς ή εξωγενείς κινόνες έχοντας ως συνένζυμο τα FAD και NAD(P)H (αναγωγικοί παράγοντες). Είναι επαγωγίμο και η έκφρασή του καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον Nrf2 (91).



Εικόνα 17: Ο μηχανισμός δράσης της NQO1

Η NQO-1 μετατρέπει τις κινόνες σε υδροκινόνες που είναι λιγότερο δραστικά μόρια και ως εκ τούτου θεωρείται ένζυμο της φάσης I του μεταβολισμού. Οι κινόνες είναι εν δυνάμει βλαβερά μόρια καθώς προέρχονται από αρωματικές ενώσεις στις οποίες τα υδρογόνα έχουν αντικατασταθεί από οξυγόνα κάτι που δύναται να οδηγήσει στην παραγωγή H_2O_2 . Προσφέροντας ηλεκτρόνια και μετατρέποντας τα οξυγόνα σε υδροξύλια (άρα τις κινόνες σε υδροκινόνες), η NQO-1 παρεμποδίζει πιθανές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που θα είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS (Εικόνα 17) (92).

1.8.1.7 Παραοξόνωση (PON)

Το όνομά της οφείλεται στην ικανότητα υδρόλυσης του παραοξόν που είναι το καλύτερα μελετημένο υπόστρωμά της. Πρόκειται για μία εστεράση που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και ευθύνεται για την υδρόλυση οργανοφωσφορικών ενώσεων. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι τριεστέρες του φωσφορικού οξέος που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα (93). Ο υποκινητής της περιέχει στοιχεία AREs, ωστόσο όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο άλλα κυτταροπροστατευτικά γονίδια (94). Σχετίζεται με τη λιποπρωτεΐνη HDL και μπορεί να προστατεύσει την LDL από οξείδωση. Αυτό αποτέλεσε αφορμή για την πραγματοποίηση αρκετών μελετών σχετικά με την επίδραση πολυφαινόλων στα επίπεδα έκφρασης και δραστηριότητας της παραοξόνωσης (95).

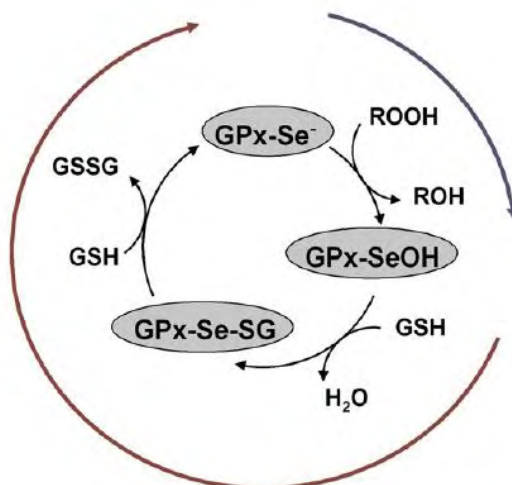
1.8.1.8 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) προσφέρει το ηλεκτρόνιό της για να εξουδετερώσει ηλεκτρονιόφιλα μόρια με αποτέλεσμα η ίδια να οξειδώνεται. Η οξειδωμένη της μορφή (GSSG) αποτελείται από δυο μόρια γλουταθειόνης ενωμένα μέσω δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των δυο κυστεϊνών. Η επαναφορά της στην ανηγμένη μορφή καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), μια φλαβοπρωτεΐνη η οποία χρησιμοποιεί το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων

(το οποίο ανάγει το συνένζυμο FAD). Κατ' αυτό τον τρόπο η GR διατηρεί την αναλογία GSH:GSSG σε φυσιολογικά επίπεδα (96).

1.8.1.9 Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Πρόκειται για μια σεληνοπρωτεΐνη (περιέχει μια σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό της κέντρο) που καταλύει το ακριβώς αντίθετο βήμα από την αναγωγή, δηλαδή μετατρέπει την ανηγμένη γλουταθειόνη σε οξειδωμένη (Εικόνα 18). Υπάρχουν 8 ισομορφές με την 1 να είναι η πλέον άφθονη. Η GPx1 δομικά είναι τετραμερής και συναντάται στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα (97). Στόχος των περοξειδασών είναι η εξουδετέρωση υπεροξειδίων (πχ λιπιδικά υπεροξειδία), προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. Η δραστηριότητα της GPx βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με τη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



Εικόνα 18: Ο μηχανισμός δράσης της GPx

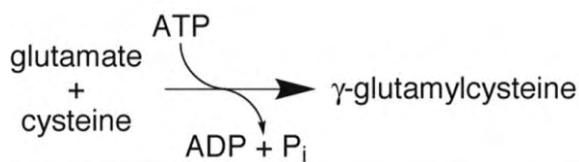
1.8.1.10 Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)

Πρόκειται για μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων που αποτοξικοποιούν μεγάλο εύρος τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, τις οποίες συνδέουν με την GSH (98). Έτσι, ελαχιστοποιούν τις πιθανότητες αλληλεπιδράσεων τέτοιων μορίων με κυτταρικά μακρομόρια (99). Η δράση τους όμως δεν περιορίζεται στην αποτοξικοποίηση μέσω GSH, καθώς συμμετέχουν, επίσης, σε βιοσυνθετικά μονοπάτια ορμονών και στην αποικοδόμηση της τυροσίνης μεταξύ άλλων (98).

Οι GSTs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες αναλόγως του κυτταρικού εντοπισμού τους: τις κυτταροπλασματικές, τις μιτοχονδριακές και τις μικροσωμικές (που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο). Μεταξύ των κυτταροπλασματικών συναντώνται και οι α-GSTs οι οποίες αφθονούν στο ήπαρ (98,100).

1.8.1.11 Λιγιάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL)

Είναι το πρώτο και ρυθμιστικό (rate-limiting) ένζυμο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της GSH και καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:



Είναι ετεροδιμερής καθώς αποτελείται από μια καταλυτική και μια ρυθμιστική υπομονάδα που προέρχονται από διαφορετικά γονίδια, τα οποία μάλιστα εδράζουν σε διαφορετικά χρωμοσώματα (101). Η σύζευξη κυστεΐνης και γλουταμικού που καταλύεται από την γ-GCL είναι ιδιαίτερη καθώς προκαλεί την ομοιοπολική σύνδεση της $-NH_2$ (αμινομάδας) της κυστεΐνης με την $-COOH$ (καρβοξυλομάδα) της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού, καθιστώντας έτσι τον συγκεκριμένο δεσμό ανθεκτικό στη διάσπαση από πεπτιδάσες. Το δεύτερο και τελικό βήμα στη βιοσύνθεση της GSH περιλαμβάνει την προσθήκη ενός καταλοίπου γλυκίνης, αντίδραση που καταλύεται από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (102).

Δεδομένης της σημασίας της γλουταθειόνης στην άμυνα του οργανισμού απέναντι σε οξειδωτικές ενώσεις, η ρύθμιση της βιοσύνθεσής της είναι ιδιαίτερης σπουδαιότητας. Η δραστηριότητα της γ-GCL εξαρτάται από την έκφραση των δυο υπομονάδων, από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση καθώς και από την πρόσβαση στα υποστρώματά της και ιδίως στην κυστεΐνη που είναι περιορισμένη (102).

1.8.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς συγκαταλέγονται τόσο ενδογενή όσο και εξωγενή μόρια που λαμβάνονται μέσω της διατροφής.

1.8.2.1 Βιταμίνες C και E

Και οι δυο αυτές ουσίες λαμβάνονται από τη διατροφή και είναι απαραίτητες για την επιβίωση. Η πρώτη είναι υδατοδιαλυτή ενώ η δεύτερη λιποδιαλυτή. Παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και λόγω της φύσης τους προστατεύουν διαφορετικά κυτταρικά μακρομόρια (πχ η βιταμίνη E λόγω της λιποδιαλυτότητας της εδράζει στις μεμβράνες και προστατεύει από λιπιδική υπεροξειδωση). Η βιταμίνη C θεωρείται ίσως το σημαντικότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό μόριο καθώς εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες προσφέροντάς τους ηλεκτρόνια. Ο μηχανισμός δράσης της παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς αδρανοποιώντας μια ρίζα οξειδώνεται και μετατρέπεται η ίδια σε ρίζα ασκορβικού οξέος η οποία όμως είναι σχετικά αδρανής σε σχέση με την αρχική ρίζα στόχο.

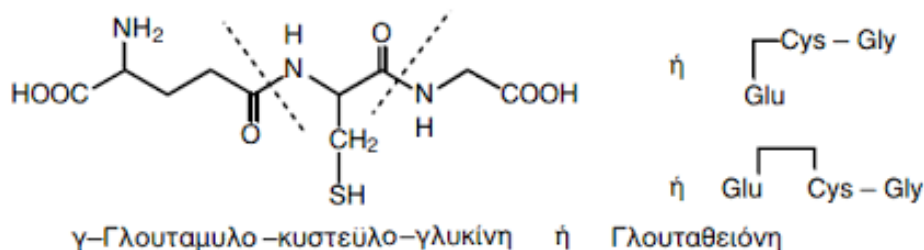
Οι βιταμίνες E (τοκοφερόλες) είναι ένα σύνολο οκτώ λιποδιαλυτών ενώσεων εκ των οποίων η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον ενεργή. Η α-τοκοφερόλη μόλις εξουδετερώσει μια ρίζα μετατρέπεται η ίδια σε ρίζα, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως η βιταμίνη C μπορεί να δράσει συνεργιστικά με την GSH, αναγεννώντας την βιταμίνη E (103).

1.8.2.2 Γλουταθειόνη

Πρόκειται για μια θειόλη μικρού μοριακού βάρους (307 Da) που αποτελείται από ένα κατάλοιπο γλουταμικού οξέος, μια κυστεΐνη και μια γλυκίνη (Εικόνα 19). Συναντάται σε αερόβιους αλλά και σε κάποιους αναερόβιους οργανισμούς σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM και είναι εξαιρετικά σημαντική για την προστασία από οξειδωτικούς παράγοντες (104,105). Διαδραματίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης όσον αφορά την θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός κυττάρου που χαρακτηρίζεται από τον λόγο θειολών/δισουλφιδίων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παρουσία του γ-πεπτιδικού δεσμού μεταξύ γλουταμικού οξέος και κυστεΐνης την καθιστά ανθεκτική στην αποικοδόμηση από πεπτιδάσες.

Έπειτα από οξείδωση η γλουταθειόνη μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδικούς δεσμούς τόσο με τον εαυτό της (GSSG) όσο και με ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες κυστεϊνών σε πρωτεΐνες. Η GSH εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα (~90%) αλλά και στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Μπορεί να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ηλεκτρόνιο είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη βοήθεια της GPx, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αναγέννηση των βιταμινών C και E. Ακόμα, συμμετέχει και στις αντιδράσεις φάσης II του μεταβολισμού ξενοβιοτικών, καθώς

με τη βοήθεια των GSTs συνδέεται ομοιοπολικά σε ξενοβιοτικά καθιστώντας τα πιο υδατοδιαλυτά και κατ' επέκταση διευκολύνοντας την απέκκρισή τους (104).



Εικόνα 19: Δομή της γλουταθειόνης

1.8.2.3 Ουβικινόνη

Πρόκειται για ένα λιποδιαλυτό συνένζυμο που συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφέροντας ηλεκτρόνια, ενώ μπορεί επίσης να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες ή να επαναφέρει την οξειδωμένη βιταμίνη E στην ενεργή της μορφή (106).

1.8.2.4 Τελικά προϊόντα καταβολισμού ενδογενών ενώσεων (Ουρικό οξύ και Χολερυθρίνη)

Στα τελικά προϊόντα καταβολισμού ενδογενών ενώσεων συμπεριλαμβάνονται το ουρικό οξύ και η χολερυθρίνη. Το πρώτο προέρχεται από τον καταβολισμό των πουρινών (μια διαδικασία στην οποία εμπλέκεται η οξειδάση της ξανθίνης) και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συναντάται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και στο πλάσμα, ενώ η αντιοξειδωτική του δράση έγκειται στην παροχή ηλεκτρονίων σε οξειδωτικά μόρια (107).

Η χολερυθρίνη προέρχεται από τον καταβολισμό της αίμης (διαδικασία στην οποία εμπλέκεται η οξυγενάση της αίμης) έπειτα από το σχηματισμό της χολοπρασίνης (μίας πράσινης τετραπυρολικής χρωστικής). *In vitro* μελέτες έχουν δείξει πως μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$ από τα ουδετερόφιλα ενώ μπορεί να εξουδετερώσει το H_2O_2 . Ακόμα, στο πλάσμα μπορεί να συνδεθεί με την αλβουμίνη προστατεύοντας τόσο αυτήν όσο και τα μεταφερόμενα λιπίδια από ελεύθερες ρίζες (108).

1.8.2.5 Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού (που δεν σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή ενέργειας) των φυτών με σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες.

Αναλυτικότερα, αποτελούν τη φυσική άμυνα του φυτού τόσο έναντι βιοτικών παραγόντων (βακτήρια, μύκητες, ιούς και έντομα), όσο και αβιοτικών παραγόντων όπως η UV ακτινοβολία και το όζον (109). Έχουν εντοπιστεί σε πολλά ήδη βρώσιμων φυτικών προϊόντων όπως φρούτα, λαχανικά, ροφήματα και ξηροί καρποί (110).

Έχουν αναφερθεί αρκετές χιλιάδες διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μέχρι σήμερα και μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες: τις πολυφαινόλες, τα τερπένια, και τις αζωτούχες ενώσεις (αλκαλοειδή) (111,112). Από τις τρεις ομάδες, οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη με >8000 αναγνωρισμένα είδη με κοινό χαρακτηριστικό τον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα (113). Οι περισσότερες πολυφαινόλες αποτελούν σύμπλοκα περισσοτέρων του ενός φαινολικού μορίου έπειτα από διμερισμό ή πολυμερισμό. Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ολόένα και περισσότερες σχετικές με την υγεία ιδιότητες έπειτα από κατανάλωση φυτικών προϊόντων (114–116).

Κατηγορίες Πολυφαινολών

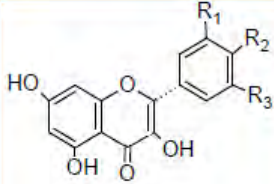
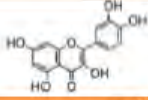
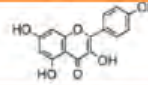
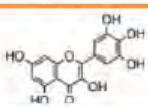
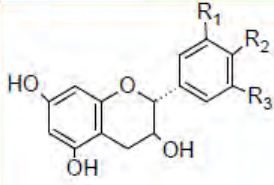
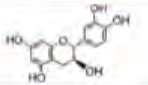
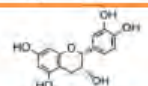
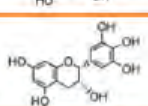
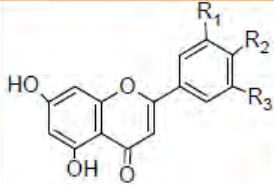
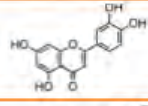
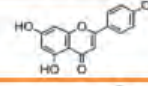
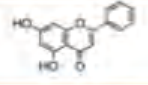
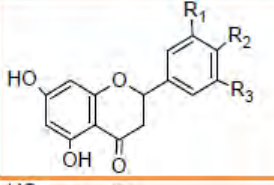
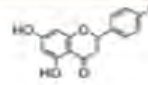
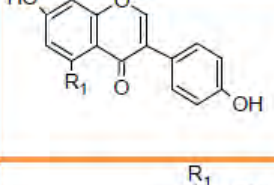
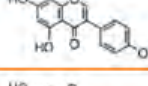
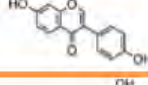
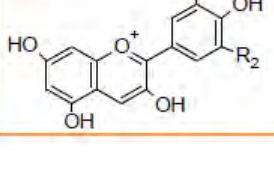
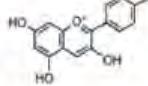
Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες αναλόγως του αριθμού αρωματικών δακτυλίων και των υποκατεστημένων ομάδων που περιέχουν:

1. Φλαβονοειδή
2. Πολυφαινολικά οξέα
3. Στιλβένια
4. Λιγνάνες

Φλαβονοειδή

Πρόκειται για την πιο καλά μελετημένη υποκατηγορία. Απαρτίζεται από >5000 διαφορετικές ενώσεις που χωρίζονται σε 6 ομάδες και συναντώνται είτε σε μονομερή ή σε πολυμερή μορφή (το δεύτερο προϋποθέτει τη σύνδεση με άλλα φλαβονοειδή ή σάκχαρα που οδηγούν σε γλυκοζυλιωμένα παράγωγα). Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από τους δύο αρωματικούς δακτύλιους που συνδέονται μέσω ενός οξυγονωμένου πυρανικού δακτυλίου και μπορούν να παρεμποδίσουν τις οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα. Μεταξύ των επιδράσεών τους στην υγεία συμπεριλαμβάνεται η μείωση συχνότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου λόγω του γαλλικού παραδόξου (117,118).

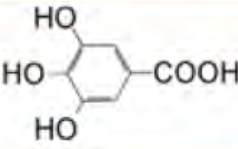
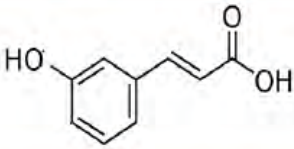
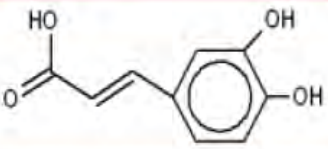
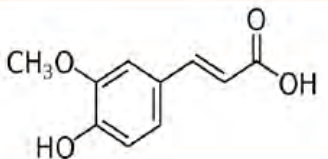
Πίνακας 1: Κατηγορίες Φλαβονοειδών

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R _{1,2,3} : -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή
Φλαβονόλες		Κερκετίνη 
		Καμπφερόλη 
		Μυρικετίνη 
Φλαβανόλες		(+)-Κατεχίνη 
		(-)-Επικατεχίνη 
		Επιγαλλοκατεχίνη 
Φλαβόνες		Λουτεολίνη 
		Απιγενίνη 
		Χρυσίνη 
Φλαβανόνες		Ναργενίνη 
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη 
		Ντετζεΐνη 
Ανθοκυανιδίνες		Κυανιδίνη 

Πολυφαινολικά οξέα

Είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή. Τα πολυφαινολικά οξέα έχουν ως βάση είτε το υδροξυκιναμικό είτε το υδροξυβενζοϊκό οξύ. Εξ αυτών των δύο, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (με χαρακτηριστικό παράδειγμα το γαλλικό οξύ) συναντώνται συνήθως σε μικρές ποσότητες στα βρώσιμα μέρη των φυτών και αποτελούν, κυρίως, υπομονάδες πολυμερών όπως είναι οι ταννίνες. Από την άλλη, τα υδροξυκιναμικά οξέα (με κυριότερα μέλη το καφεϊκό, το κουμαρικό και το φερουλικό οξύ) βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα υδροξυβενζοϊκά και συνήθως γλυκοζυλιώνονται ή μπορούν να σχηματίσουν εστέρες με το κινικό (κατά κύριο λόγο), το σικιμικό ή το ταρταρικό οξύ. Αξίζει να σημειωθεί πως η εστεροποίηση καφεϊκού οξύ και το κινικού οξέος οδηγεί στο σχηματισμό του χλωρογενικού οξέος, της κυριότερης πολυφαινολικής ομάδας του καφέ (5,119,120). Λόγω των χλωρογενικών οξέων και της ευρείας καθημερινής κατανάλωσης του, ο καφές συνιστά μια από τις κυριότερες πηγές αντιοξειδωτικών μορίων μέσω της διατροφής. Αξίζει να σημειωθεί πως τα συγκεκριμένα μόρια έχουν επιδείξει μια σειρά ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία, όπως η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (121,122).

Πίνακας 2: Χημική δομή των πολυφαινολικών οξέων

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
Γαλλικό Οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		C ₇ H ₆ O ₅
Κουμαρικό Οξύ	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		C ₉ H ₈ O ₃
Καφεϊκό οξύ	3 - (3,4-διυδροξυφαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ		C ₉ H ₈ O ₄
Φερουλικό οξύ	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ		C ₁₀ H ₁₀ O ₄

Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των διαιτητικά προσλαμβανόμενων πολυφαινολών. Η πιο χαρακτηριστική πολυφαινόλη αυτής της κατηγορίας είναι η ρεζβερατρόλη, η οποία αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και συναντάται σε σημαντικές ποσότητες στο κόκκινο κρασί. Σύμφωνα με έρευνες, παρουσιάζει σημαντικές ιδιότητες καθώς έχει καρδιοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση (123).

Λιγνάες

Η συγκεκριμένη πολυφαινολική ομάδα προκύπτει από τη σύνδεση δυο φαινυλπροπανικών μορίων. Ο λιναρόσπορος αποτελεί την κυριότερη πηγή ενώ έχουν μελετηθεί για την πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση τους (124).

Βιολογικές δράσεις πολυφαινολών

Η αποσαφήνιση της βιολογικής δράσης των πολυφαινολών είναι ένα περίπλοκο ζήτημα. Αφενός στα τρόφιμα απαντώνται ως μίγματα, η σύσταση των οποίων ποικίλει αναλόγως του φυτού

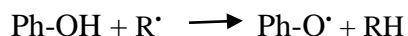
και των περιβαλλοντικών συνθηκών στις οποίες αυτό μεγαλώνει (παρουσία βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων) κι έτσι είναι δύσκολη η ανάλυση της επίδρασης κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αφετέρου, ακόμα και μετά από απομόνωση, η ανάλυση της βιοδραστικότητας αποτελεί πρόκληση καθώς επηρεάζεται από την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και τον καταμερισμό της πολυφαινόλης και των μεταβολιτών της στον οργανισμό (125). Για παράδειγμα, ο καφές περιέχει πάνω από 1000 πιθανά βιοδραστικά μόρια.

Έχει διεξαχθεί πληθώρα μελετών σχετικά με τις πιθανώς ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινόλων στην υγεία, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι ασαφή, ιδίως στις *in vivo* μελέτες (115,126,127).

Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινόλων

Λόγω της χημικής τους σύνθεσης (υποκατεστημένος με υδροξύλια αρωματικός δακτύλιος) οι πολυφαινόλες μπορούν να προσφέρουν ηλεκτρόνια σε ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνοντας τες παρουσιάζοντας έτσι αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται στη χημική φύση του αρωματικού δακτυλίου που αποδυναμώνει το δεσμό μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου της υδροξυλικής ομάδας επιτρέποντας τη μεταφορά είτε του πρωτονίου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) είτε ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) (128). Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική ικανότητα σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οφείλεται στη χηλική δράση, με αποτέλεσμα τη δέσμευση μετάλλων όπως ο σίδηρος και την αποτροπή αντιδράσεων Fenton (128). Αξίζει να σημειωθεί πως η δραστικότητα των πολυφαινόλων συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων.

Η ικανότητα τους να προσφέρουν ηλεκτρόνια οφείλεται στο χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής του. Έτσι, μόρια με υψηλότερο δυναμικό (παραδείγματος χάριν οι ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και $\cdot OH$) μπορούν να εξουδετερωθούν από τις πολυφαινόλες σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Όπου R^{\cdot} ελεύθερη ρίζα, Ph-OH φαινολικό μόριο και Ph-O \cdot φαινοξυλική ρίζα.

Το καθοριστικό γεγονός αυτής της αντίδρασης, και συνολικά της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινόλων είναι πως η φαινοξυλική ρίζα (ή ρίζα ημικιόννης) είναι περισσότερο σταθερή από την αρχική ρίζα, με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται και να μην πυροδοτεί έναν καινούργιο

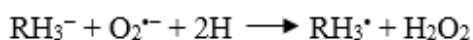
οξειδωτικό μηχανισμό. Η σταθεροποίηση της ημικιμόνης προκύπτει μέσω αλληλεπίδρασης με μια δεύτερη ρίζα (πχ μια ακόμα ημικιμόνη) που οδηγεί στη σταθερή δομή κιμόνης (128).

Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

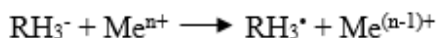
Ωστόσο, πέρα από την καλά μελετημένη αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, έχει παρατηρηθεί πως μπορούν να δράσουν και και προοξειδωτικά. Σε αυτό παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο ο αριθμός των υδροξυλομάδων όσο και η θέση των υποκαταστάσεων ενώ μπορούν να επηρεάσουν και η συγκέντρωση των πολυφαινολών, η παρουσία μετάλλων μετάπτωσης (σίδηρος και χαλκός) και το pH (126,129). Ο συνδυασμός όλων αυτών των παραγόντων καθορίζει το αν οι πολυφαινόλες θα δράσουν αντιοξειδωτικά ή προοξειδωτικά.

Οι ημικιμόνες που παράγονται από τις πολυφαινόλες κατά τον μηχανισμό εξουδετέρωσης μια ρίζας έχουν χρόνο ημιζώης 200 μs και μπορούν να οξειδωθούν περαιτέρω οδηγώντας μεταξύ άλλων και στις πιο σταθερές κιμόνες. Ωστόσο, οι ημικιμόνες μπορούν (παρουσία στοιχείων μετάπτωσης) να αλληλεπιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας ρίζα σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, με όλες τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν αυτά ως δραστικές μορφές οξυγόνου.

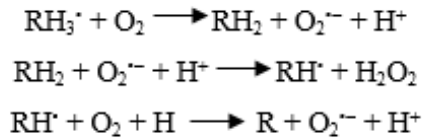
Αναλυτικότερα, αρχικά παρατηρείται η οξείδωση της πολυφαινολικής ομάδας που οδηγεί σε ρίζα ημικιμόνη με ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου σε σουπεροξειδίου:



Στοιχεία μετάπτωσης (πχ Fe^{2+} , Cu^+) μπορούν να πυροδοτήσουν την αυτοοξείδωση των πολυφαινολών:



Ακόμα, ημικιμόνες παράγονται και ενζυμικά μέσω αλληλεπίδρασης μιας πολυφαινόλης με το κυτόχρωμα P-450 και εν συνεχεία συμμετέχουν σε μια αλυσίδα αντιδράσεων που μετατρέπουν την πολυφαινόλη σε κιμόνη:



Έτσι, φαίνεται πως τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξειδωσης των πολυφαινολών μπορούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών, προκαλώντας έτσι οξειδωτικό στρες στο κύτταρο. Για παράδειγμα, μπορούν να οξειδώσουν και να εξαντλήσουν τα αποθέματα GSH. Αυτή ακριβώς η ιδιότητα όμως, πιθανώς έχει προεκτάσεις στις αντικαρκινικές θεραπείες. Αναλυτικότερα, σε κυτταρικές σειρές *in vitro* έχει φανεί πως η χορήγηση πολυφαινολών προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Αυτό οδήγησε στην ιδέα χρήσης πολυφαινολών σαν συμπληρωματική θεραπεία με σκοπό να «ευαισθητοποιήσουν» τον καρκινικό όγκο ώστε να μειωθεί η δόση του κυρίως φαρμάκου (και άρα και των επιπτώσεων που έχει αυτό στα φυσιολογικά κύτταρα) (129,130).

Σκοπός της έρευνας

Τα τελευταία χρόνια ο καφές έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς πέρα από τα ευχάριστα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά που τον καθιστούν μια καθημερινή συνήθεια σε όλο τον κόσμο, περιέχει ποικιλία πιθανών βιοδραστικών μορίων. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι μόρια του καφέ όπως τα χλωρογενικά οξέα παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενώ αναφέρεται και η πιθανή συσχέτιση της κατανάλωσής τους με τη μείωση κινδύνου εμφάνισης διαφόρων τύπου καρκίνου και μεταβολικών διαταραχών. Ένα από τα κύρια ερωτήματα είναι ο βαθμός επιρροής της δραστικότητας από το καβούρδισμα, την προέλευση και το είδος του καφέ καθώς και το κατά πόσο είναι ικανός ο καφές να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (και συνεπώς του οργανισμού). Ακόμα, παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού (ή μηχανισμών) μέσω του οποίου ο καφές επιδρά στον οργανισμό.

Ο σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από διάφορες ποικιλίες καφέ ανά τον κόσμο (τόσο καβουρδισμένες όσο και πράσινες). Οι ισχυρότερες επιλέχθηκαν με στόχο να μελετηθεί η επίδρασή τους με τη μορφή εκχυλισμάτων στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σε δείκτες οξειδωτικού στρες και στα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, το ισχυρότερο από αυτά τα εκχυλίσματα, όπως αυτό φάνηκε από την *in vitro* δράση του, χορηγήθηκε σε επίμυες και μετρήθηκαν δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς και τα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, ώστε να μελετηθεί το αποτέλεσμα που είχε η κατανάλωση μέτριας ποσότητας καφέ σε διάφορους ιστούς. Τα αποτελέσματα αναμένεται να βοηθήσουν στην διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ, ο οποίος αποτελεί ήδη μέρος της καθημερινότητάς μας, μέσω του οποίου επιδρά στον οργανισμό, με τελικό στόχο την βελτιστοποίηση της ποσότητας, του καβουρδίσματος και της ποικιλίας που καταναλώνεται, ειδικά από ανθρώπους που πάσχουν από ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων καφέ

Το πρώτο στάδιο της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός συνόλου ποικιλιών καφέ από διάφορες χώρες. Εξετάστηκαν τόσο πράσινοι όσο και καβουρδισμένοι κόκκοι για να αποσαφηνιστεί η πιθανή επίδραση του καβουρδίσματος στη δραστηριότητα του καφέ. Αξίζει να σημειωθεί πως σε μια ποικιλία εξετάστηκαν 4 διαφορετικοί χρόνοι καβουρδίσματος που αντιστοιχούν σε εμπορικά χρησιμοποιούμενα ψησίματα (από ελαφρύ καφέ φίλτρου μέχρι βαρύ εσπρέσο). Ακόμα μελετήθηκαν δείγματα και από τις δυο κύριες εμπορικές ποικιλίες καφέ (*C. arabica* και *C. canephora*) καθώς και ένα ντεκαφεϊνέ χαρμάνι (μίγμα ποικιλιών *C. arabica*) που είχε αποκαφεϊνοποιηθεί με τη μέθοδο Swiss water®. Αρχικά ετοιμάστηκαν εκχυλίσματα από κάθε ποικιλία και μετρήθηκε το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Ακολούθως, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική και η προστατευτική ικανότητα των εκχυλισμάτων απέναντι στο DNA με μια σειρά δοκιμασιών για την όσο το δυνατόν καλύτερη εκτίμηση της δραστηριότητας των διαφορετικών ποικιλιών.

Ο στόχος αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων του καβουρδίσματος (και των διαφορετικών βαθμών του), της προέλευσης, του είδους και της αποκαφεϊνοποίησης στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καφέ, με απώτερο στόχο την επιλογή των πιο δραστικών ποικιλιών ώστε να χρησιμοποιηθούν στις επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

2.1.1 Δείγματα καφέ και προετοιμασία εκχυλισμάτων

Συνολικά παρελήφθησαν 12 ποικιλίες καφέ (11 εκ των οποίων του είδους *C. arabica* και 1 του είδους *C. canephora*) από τη συνεργαζόμενη εταιρία Coffee Island SA. Για κάθε ποικιλία υπήρχε τόσο ένα δείγμα πράσινων κόκκων όσο κι ένα δείγμα καβουρδισμένων κόκκων με εξαίρεση μια ποικιλία *C. arabica* (Brazil) για την οποία ελήφθησαν εκχυλίσματα που πρήρθαν από δείγματα μετά από 4 διαφορετικούς χρόνους ψησίματος. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η ονομασία και ο χρόνος καβουρδίσματος για κάθε ποικιλία:

Πίνακας 3: Ονομασία και χρόνος καβουρδίσματος ποικιλιών καφέ

#	Ποικιλία καφέ	T (°C)	min
1	Colombia	210	12,30
2	Kenya	210	12
3	Rwanda	211	12,30
4	Sidamo	211	12
5	Caracolito	215	11
6	Robusta (<i>C. canephora</i>)	218	12,30
7	Decaffeinated (Χαρμάνι)	208	12
8	Nicaragua	215	12,30
9	Costa Rica	209	12,30
10	Guatemala	215	12,30
11	Rio	194	11,30
12	Brazil	215	4
			5
			6
			7

Αξίζει να σημειωθεί πως οι ποικιλίες #1-11 καβουρδίστηκαν σε διαφορετικό καβουρδιστήρι σε σχέση με την #12. Καβούρδισμα για 12 λεπτά στο πρώτο καβουρδιστήρι (των # 1-11) αντιστοιχεί σε 6 λεπτά στο δεύτερο (της #12). Ακόμα, η κάθε ποικιλία από τις #1-11 καβουρδίστηκε σε βαθμό εσπρέσσο, ενώ αντίθετα για την #12 παρελήφθησαν 4 διαφορετικοί βαθμοί καβουρδίσματος, από ένα ελαφρά καβουρδισμένο (4) έως κι ένα σχεδόν καμένο (7). Το αποκαφεϊνοποιημένο δείγμα είναι χαρμάνι, δηλαδή προήλθε από ανάμιξη κόκκων διαφορετικών ποικιλιών (όλες του είδους *C. arabica*).

Τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα προήλθαν έπειτα από σπάσιμο των κόκκων σε γουδί με τη χρήση υγρού αζώτου. Στη συνέχεια, διαλύματα συγκέντρωσης 10% w/v της σκόνης που προέκυψε υποβλήθηκαν σε υπέρηχους για 20 min (70% ισχύς, 0,7 sec cycle). Επόμενο βήμα ήταν η ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος η φυγοκέντρωση (3000 g, 10 min, 25°C) μετά από την οποία συλλέχθηκε το υπερκείμενο, το οποίο και διατηρήθηκε στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

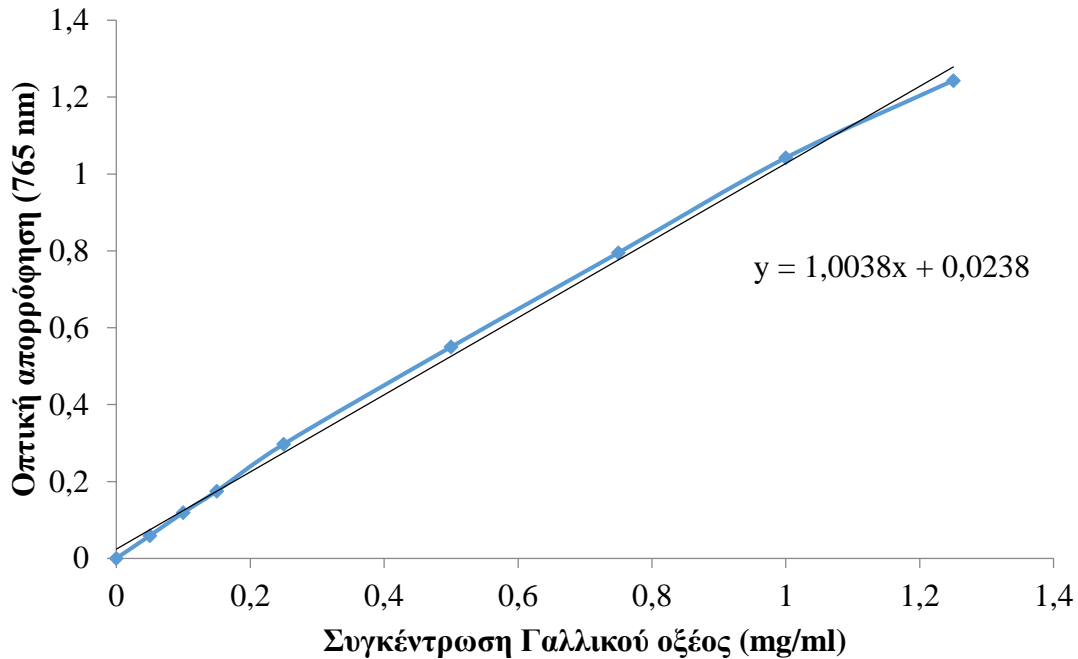
2.1.2 Προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου βασίζεται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ένα μίγμα σύνθετων πολυμερών ιόντων από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Αυτό το μίγμα αλληλεπιδρά με τις πολυφαινολικές ενώσεις δίνοντας μια χαρακτηριστική μπλε ένωση που απορροφά στα 765 nm (131). Απαραίτητη παράμετρος της αντίδρασης είναι η ρύθμιση της αλκαλικότητας μέσω κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3).

Αναλυτικότερα, σε σωληνάρια των 2 ml αναμίχθηκε απιονισμένο νερό (dH_2O , 1 ml) και το εκχύλισμα (20 μl) με εξαίρεση το τυφλό στο οποίο αντί για εκχύλισμα προστέθηκε dH_2O . Επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη του αντιδραστήριου FC (100 μl), ανακίνηση των δειγμάτων και προσθήκη του διαλύματος Na_2CO_3 25% w/v (280 μl) έπειτα από 3 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τελικά συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τα 2ml με απιονισμένο H_2O . Τα δείγματα ανακινήθηκαν ξανά, επώαστηκαν για 60 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 765 nm σε σχέση με το τυφλό δείγμα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν. Αξίζει να σημειωθεί πως εξετάστηκε η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων και απουσία του αντιδραστήριου FC ώστε να αφαιρεθεί από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

Για τον υπολογισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (πρότυπη πολυφαινόλη), καθώς τα εκχυλίσματα καφέ πιθανόν να χρειάζονταν αραιώση πριν τη μέτρηση για να εμπίπτουν στα όρια της πρότυπης καμπύλης (Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η δοκιμασία FC είναι γραμμική για συγκεντρώσεις πολυφαινολών έως και 1,4 mg/ml). Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000 και 1250 $\mu\text{g/ml}$ γαλλικού οξέος, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος



Εικόνα 20: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος

Με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης που λήφθηκαν από τις παραπάνω συγκεντρώσεις προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,0038x + 0,0238$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης $R^2 = 0,9978$ (Εικόνα 20). Το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων εκφράζεται ως $\mu\text{g GA}/\text{mg}$ εκχυλίσματος, όπου GA: Gallic acid.

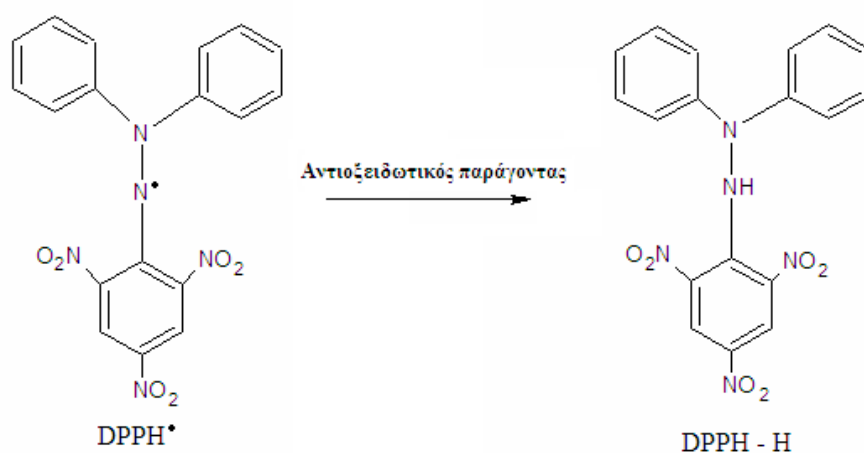
2.1.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών

2.1.3.1 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•]

Η δοκιμασία αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams και συνεργάτες (132). Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζιλίου (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH[•]). Πρόκειται για μια από τις πιο απλές μεθόδους στα αρχικά στάδια χαρακτηρισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος ή μιας ουσίας. Τα εξεταζόμενα μόρια αλληλεπιδρούν και εξουδετερώνουν το DPPH[•] μέσω είτε μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT). Το DPPH[•] είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, μωβ χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm. Η εξουδετέρωσή της από ένα αντιοξειδωτικό

οδηγεί στην παραγωγή της αντίστοιχης υδραζίνης που έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης.

Αναλυτικότερα, σε σωληνάκι του 1,5 ml προστέθηκαν 900 μL μεθανόλης, 50 μL του εκχυλίσματος καφέ σε διάφορες συγκεντρώσεις και 50 μL DPPH $^{\bullet}$ (0,1 mM). Ακολούθησε ανακίνηση, επώαση στο σκοτάδι σε RT και φωτομέτρηση στα 517 nm. Σε κάθε μέτρηση υπήρχε το αντίστοιχο τυφλό κάθε δείγματος (απουσία της ρίζας) καθώς και ο μάρτυρας (μόνο ρίζα και μεθανόλη). Πριν τη φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε μηδενισμός του φωτομέτρου με μεθανόλη. Κάθε δείγμα μετρήθηκε σε τριπλέτα ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα για το κάθε εκχύλισμα καφέ.



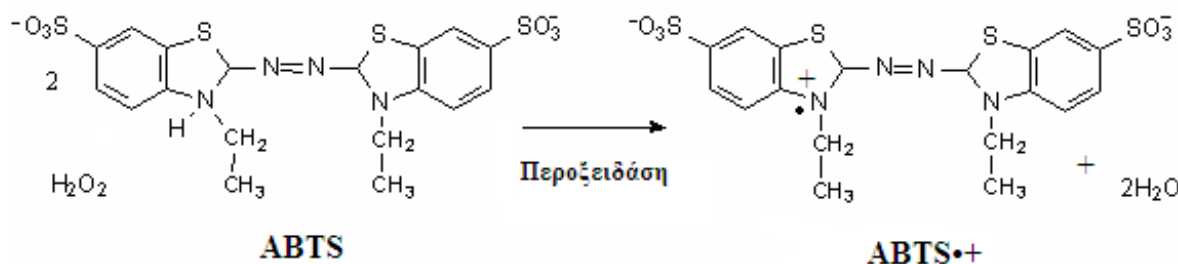
Εικόνα 21: Αλληλεπίδραση της ρίζας DPPH $^{\bullet}$ με ένα αντιοξειδωτικό

2.1.3.2 Ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS $^{+\bullet}$

Αυτή η δοκιμασία αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Cano και συνεργάτες (133) και βασίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας [2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid), ABTS $^{+\bullet}$). Ο μηχανισμός εξουδετέρωσης είναι παρεμφερής με τη ρίζα DPPH $^{\bullet}$ καθώς το ABTS $^{+\bullet}$ μπορεί να εξουδετερωθεί τόσο μέσω SET όσο και μέσω HAT. Ωστόσο, το ABTS $^{+\bullet}$ συγκριτικά με το DPPH $^{\bullet}$ δεν είναι σταθερή ρίζα, αντιθέτως πρέπει να παραχθεί και μετά να ακολουθήσει η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος.

Μόλις σχηματιστεί, η ρίζα ABTS $^{+\bullet}$ είναι πράσινης απόχρωσης, σταθερή και απορροφά μέγιστα στα 730 nm. Η αλληλεπίδραση με κάποιο αντιοξειδωτικό οδηγεί σε εξουδετέρωση και αποχρωματισμό άρα και μείωση απορρόφησης.

Αρχικά παράχθηκε η ρίζα ABTS^{•+} μέσω της περοξειδάσης του χρένου (Horseradish peroxidase, HRP), παρουσία H₂O₂. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 ml (1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ και 6 μM περοξειδάση). Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι σε RT για 45 min. Ακολούθως προστέθηκαν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα σε διάφορες συγκεντρώσεις (εξαιρέση ο μάρτυρας στον οποίο δεν προστέθηκε κάτι) και η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης έγινε στα 730 nm. Όπως και στην προηγούμενη δοκιμασία, κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος είχε και το αντίστοιχο τυφλό (χωρίς την προσθήκη της HRP). Τα δείγματα μετρήθηκαν σε τριπλέτες ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα για το καθένα.



Εικόνα 22: Παραγωγή της σταθερής ρίζας ABTS^{•+}

2.1.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ (radical scavenging capacity, RSC), υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση των ριζών} = [(A_c - A_\delta) / A_c] \times 100$$

A_c: Οπτική απορρόφηση του μάρτυρα (μέση τιμή της τριπλέτας).

A_δ: Οπτική απορρόφηση του δείγματος (μέση τιμή της τριπλέτας).

Προκειμένου να συγκριθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, αρχικά υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ (η συγκέντρωση του δείγματος που οδηγεί σε εξουδετέρωση των ριζών κατά 50%). Εν συνεχεία υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα (specific activity) του κάθε δείγματος συνδυάζοντας τόσο την IC₅₀, όσο και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Αναλυτικότερα, η ειδική ενεργότητα εκφράστηκε ως units ανά mg καφέ, όπου 1 unit αφορούσε την ποσότητα πολυφαινολών του εκχυλίσματος που αντιστοιχούσε στην συγκέντρωση της τιμής IC₅₀. Όσο

μεγαλύτερη η τιμή της ειδικής ενεργότητας τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του εξεταζόμενου δείγματος.

2.1.4 Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος

Η αναγωγική ισχύς προσδιορίστηκε με βάση το πρωτόκολλο των Yen και συνεργατών (134). Η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι ενδεικτική της ικανότητας των συστατικών ενός εκχυλίσματος να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων (αναγωγική δράση), χαρακτηριστικό που σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Στην παρούσα μέθοδο, ενώσεις με αναγωγική ικανότητα ανάγουν τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} ο οποίος με τη σειρά του συμπλοκοποιείται με τον χλωριούχο σίδηρο και απορροφά στα 700 nm. Αύξηση απορρόφησης υποδηλώνει και μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ ενός εκχυλίσματος.

Αναλυτικότερα, τα εκχυλίσματα καφέ διαλύθηκαν -σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις- σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,2M, pH 6,6), ενώ 250 μl του διαλύματος προστέθηκαν σε 250 μl σιδηροκυανιούχου καλίου (1%) και επώαστηκαν στους 50 °C για 20 min. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min και προστέθηκαν 250 μl TCA (10%). Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (3000 g, 10 min, 25°C) και 500 μl του υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάκι όπου προστέθηκαν 500 μl dH₂O καθώς και 100 μl χλωριούχου σιδήρου (0,1 %). Τα δείγματα αναδεύτηκαν, επώαστηκαν για 10 min σε RT και φωτομετρήθηκαν στα 700 nm. Κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος είχε και το αντίστοιχο τυφλό, η απορρόφηση του οποίου αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Για τη σύγκριση των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε ξανά η ειδική ενεργότητα (specific activity), για τον υπολογισμό της οποίας δημιουργήθηκε για κάθε εκχύλισμα διάγραμμα απορρόφησης/συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση καφέ που είχε οπτικής απορρόφησης ίση με 0,5 επιλέχθηκε για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας.

2.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης έναντι της πρόκλησης ρήξεων στο DNA από ελεύθερες ρίζες

2.1.5.1 Μέθοδοι χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assays)

Χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (η κάθε μια από διαφορετικό οξειδωτικό παράγοντα) για την αποτίμηση της προστατευτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων καφέ απέναντι στο DNA. Οι δοκιμασίες αυτές βασίζονται στην διαφορετική

κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ανάλογα με τη διαμόρφωσή του (η οποία εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσής του). Το πλασμιδιακό DNA συναντάται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση όπου το DNA είναι άθικτο και έχει την πιο συμπυκνωμένη διαμόρφωση, άρα τρέχει και πιο γρήγορα.
2. Την ανοιχτή κυκλική, η οποία παρατηρείται όταν προκληθούν μονόκλωνα σπασίματα (πχ από τη δράση οξειδωτικών παραγόντων) και τρέχει πιο αργά στο πήκτωμα.
3. Τη γραμμική διαμόρφωση την οποία το DNA λαμβάνει όταν υποστεί δίκλωνες ρήξεις.

Η προστατευτική δράση του καφέ απέναντι στο DNA αποτιμάται ως προς την παρεμπόδιση της μετατροπής DNA από υπερελικωμένο σε ανοιχτό κυκλικό μέσω εξουδετέρωσης των εκάστοτε οξειδωτικών παραγόντων.

2.1.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμίδιο (Bluescript-SK+) απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια (*E. coli*). Αρχικά 5 ml θρεπτικού μέσου (LB broth, NaCl, 100 μg/ml αμπικιλίνη) επιμολύνθηκαν με *E. coli* που έφεραν το πλασμίδιο. Έπειτα από επώαση 4 ωρών στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm), πραγματοποιήθηκε ολονύκτια ανακαλλιέργεια σε 100 ml θρεπτικού. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με πρώτο βήμα το χωρισμό της καλλιέργειας σε δυο σωληνάρια των 50 ml, τη φυγοκέντρηση (4000 g, 10 min, 4°C) και την απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο κάθε ίζημα προστέθηκαν 4 ml διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8). Έπειτα από επαναδιάλυση και επώαση για 5 min σε RT προστέθηκαν 8 ml διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Το αλκαλικό διάλυμα προκάλεσε διαύγαση και αμέσως μετά ακολούθησε η προσθήκη 6 ml διαλύματος 3 (5 M C₂H₃O₂K, 11,5% οξικό οξύ). Τα δείγματα επώαστηκαν για 8 min σε RT και ακολούθησε φυγοκέντρηση (3214 g, 20 min, 4°C) και μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο σωλήνα. Ο όγκος του υπερκείμενου μετρήθηκε και επαναλήφθηκε η προηγούμενη φυγοκέντρηση. Κατόπιν, στο εναπομείναν υπερκείμενο προστέθηκε παγωμένη προπανόλη σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση (3214 g, 20 min, 4°C) και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα προστέθηκε παγωμένη αιθανόλη 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Έπειτα από ανάδευση και νέα φυγοκέντρηση (3214 g, 20 min, 4°C), το υπερκείμενο

απομακρύνθηκε και το ίζημα έπειτα από ξήρανση επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, RNase 10 µg/ml).

Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260, όπου $OD_{260}=1$ μεταφράζεται σε 50 µg/ml DNA. Η αποτίμηση της καθαρότητας του δείγματος από πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 280 nm και υπολογίστηκε ο λόγος 260/280, όπου τιμές >1,8 υποδηλώνουν δείγμα υψηλής καθαρότητας.

2.1.5.3 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων ρήξεων στο DNA

Η δοκιμασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Chang και συνεργατών (135). Γίνεται χρήση του οξειδωτικού παράγοντα 2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH), ο οποίος έπειτα από θερμική διάσπαση δίνει ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Αυτό το είδος ρίζας προσομοιάζει τις ρίζες που παράγονται φυσιολογικά ως παρελκόμενο της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Επιπροσθέτως, αυτές οι ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μονόκλωνες ρήξεις στο DNA, κάτι που στην περίπτωση του πλασμιδιακού DNA οδηγεί σε αλλαγή διαμόρφωσης. Έτσι, ένα αντιοξειδωτικό/προστατευτικό εκχύλισμα αναστέλλει τη βλάβη στο DNA διατηρώντας την αρχική υπερελικωμένη διαμόρφωση.

Αναλυτικά, ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 10 µl και το μίγμα περιέχει 3,2 µg πλασμιδιακό DNA, διάφορες συγκεντρώσεις του υπό εξέταση εκχυλίσματος καθώς και 2,5 mM AAPH σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 45 min στους 37°C στο σκοτάδι. Η αντίδραση τερματίστηκε έπειτα από προσθήκη του διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιείχε AAPH, ούτε εκχύλισμα, ενώ ο θετικό μάρτυρας περιείχε AAPH, αλλά όχι εκχύλισμα. Αξίζει να σημειωθεί πως το κάθε εκχύλισμα εξετάστηκε και μόνο του (χωρίς την προσθήκη AAPH) στη μεγαλύτερη συγκέντρωση για να φανεί αν έχει κάποια επίδραση στη διαμόρφωση του DNA.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 100 V. Ακολούθησε η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 µg/ml) για 30 min και ο αποχρωματισμός με dH₂O για 30 min. Η ένταση των ζωνών εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Alpha Innotech. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις τριπλούν.

2.1.5.4 Επαγόμενη από ρίζες HO[•] πρόκληση μονόκλωνων ρήξεων στο DNA

Η δοκιμασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Keum και συνεργατών (136). Αναλυτικότερα, προκλήθηκαν μονόκλωνες ρήξεις στο DNA (όπως και στην παραπάνω μέθοδο), ωστόσο με διαφορετικό μηχανισμό, και δη με τη χρήση ριζών HO[•]. Η παραγωγή των τελευταίων πραγματοποιήθηκε μέσω της επίδρασης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), η οποία φωτολύει το H₂O₂. Η πρόκληση μονόκλωνων ρήξεων προκάλεσε αλλαγή της διαμόρφωσης και άρα της κινητικότητας του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης. Όπως και με τις ρίζες περοξυλίου, η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων καφέ εκτιμήθηκε μέσω της αναστολής πρόκλησης των ρήξεων του DNA.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl και περιείχε 3,2 μg DNA, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10 mM, 1 mM EDTA, pH 8), εκχύλισμα καφέ σε διάφορες συγκεντρώσεις καθώς και 40 mM H₂O₂. Η προσθήκη του υπεροξειδίου ακολουθήθηκε από ανάδευση και τοποθέτηση κάτω από λάμπα UV ακτινοβολίας για 3 min σε απόσταση 50 cm. Μετά το πέρας των 3 λεπτών προστέθηκαν 3 μl διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη) για τον τερματισμό της αντίδρασης και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%) παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Μετά το διαχωρισμό ακολούθησε η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/ml) για 30 min και στη συνέχεια ο αποχρωματισμός με dH₂O για 30 min. Ο αρνητικός μάρτυρας για κάθε πείραμα περιείχε μόνο πλασμιδιακό DNA ενώ ο θετικός μάρτυρας είχε επίσης H₂O₂.

Η ένταση των ζωνών για τον προσδιορισμό της αναστολής αποτιμήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Alpha Innotech. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμαζόταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

2.1.5.5 Προσδιορισμός της προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων καφέ έναντι της επαγόμενης από ελεύθερες ρίζες πρόκλησης μονόκλωνων ρήξεων στο DNA

Αρχικά υπολογίζεται η τιμή IC₅₀ για το κάθε εκχύλισμα, που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του καφέ που αναστέλλει κατά 50% τη μετάβαση του πλασμιδίου από την υπερελικωμένη στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Η % αναστολή υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left[\frac{(S_{\theta x} - S_{\delta})}{(S_{\theta} - S_{\delta})} \right] \times 100$$

S_θ: Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο θετικό μάρτυρα

S_δ: Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο δείγμα

S₀: Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στον αρνητικό μάρτυρα

Από τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε καμπύλη αναστολής/συγκέντρωσης από την οποία προκύπτει και η τιμή IC₅₀. Ακολούθως, υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα του κάθε εκχυλίσματος όπως και στην περίπτωση των δοκιμασιών DPPH[•] και ABTS^{•+}. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της ειδικής ενεργότητας, τόσο ισχυρότερη προστατευτική δράση εμφανίζουν τα εκχυλίσματα.

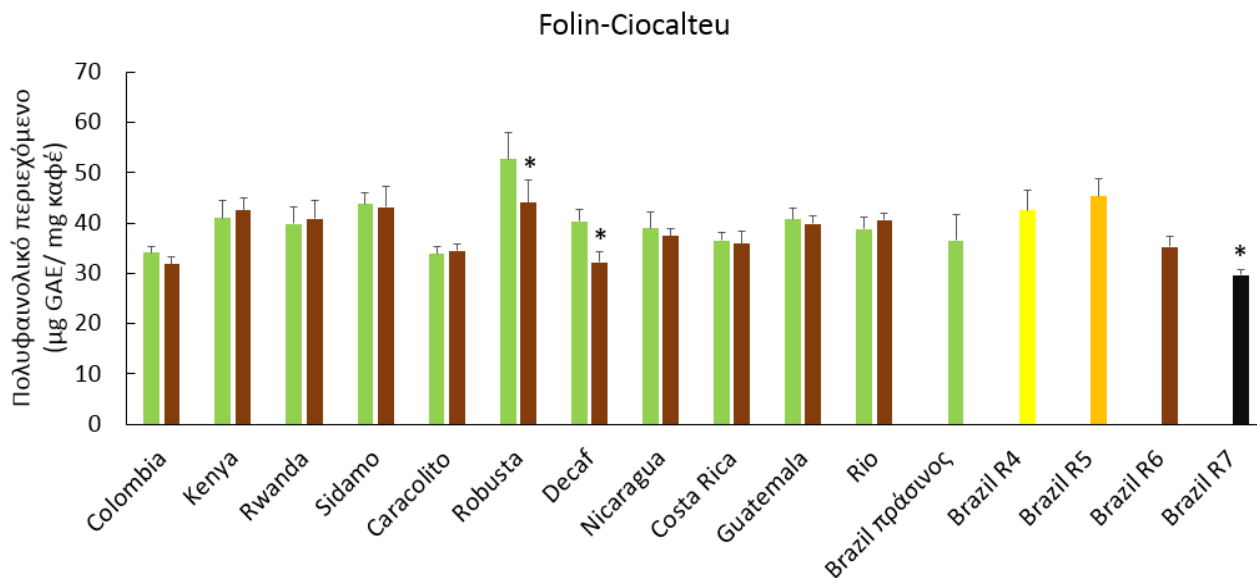
2.1.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό SPSS 20.0. Για τη σύγκριση μεταξύ καβουρδισμένων και πράσινων κόκκων των διαφόρων ποικιλιών χρησιμοποιήθηκε η one way ANOVA με στάθμη σημαντικότητας το $p < 0,05$.

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων καφέ

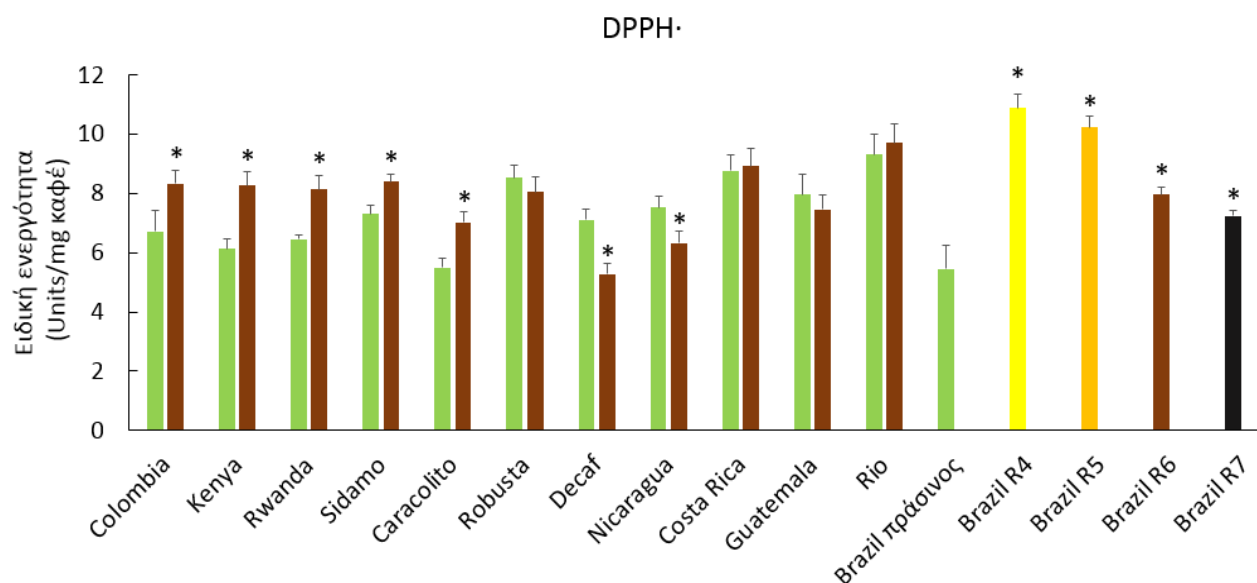
Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων καφέ, όπως μετρήθηκε με τη μεθοδο Folin-ciocalteu φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1):



Διάγραμμα 1: Συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων καφέ εκφρασμένο σε µg Gallic Acid Equivalents/ mg καφέ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Αναφέρεται ότι στην ποικιλία Brazil υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου των πράσινων και των αντίστοιχων καβουρδισμένων κόκκων.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φάνηκε πως το καβούρδισμα στις περισσότερες περιπτώσεις δεν επηρέασε αρνητικά το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις του Robusta, του χαρμανιού Decaf καθώς και του περισσότερου καβουρδισμένου δείγματος Brazil (R7). Η μέση περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις ήταν $40,06 \pm 5,15$ µg GAE/g καφέ για τους πράσινους κόκκους και $38,42 \pm 4,35$ µg GAE/g καφέ για τους καβουρδισμένους. Το δείγμα με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ήταν το Brazil R7 με $29,61 \pm 1,02$ µg GAE/g καφέ ενώ αντίθετα το δείγμα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ήταν το πράσινο Robusta.

2.2.2 Εξουδετέρωση ρίζας DPPH

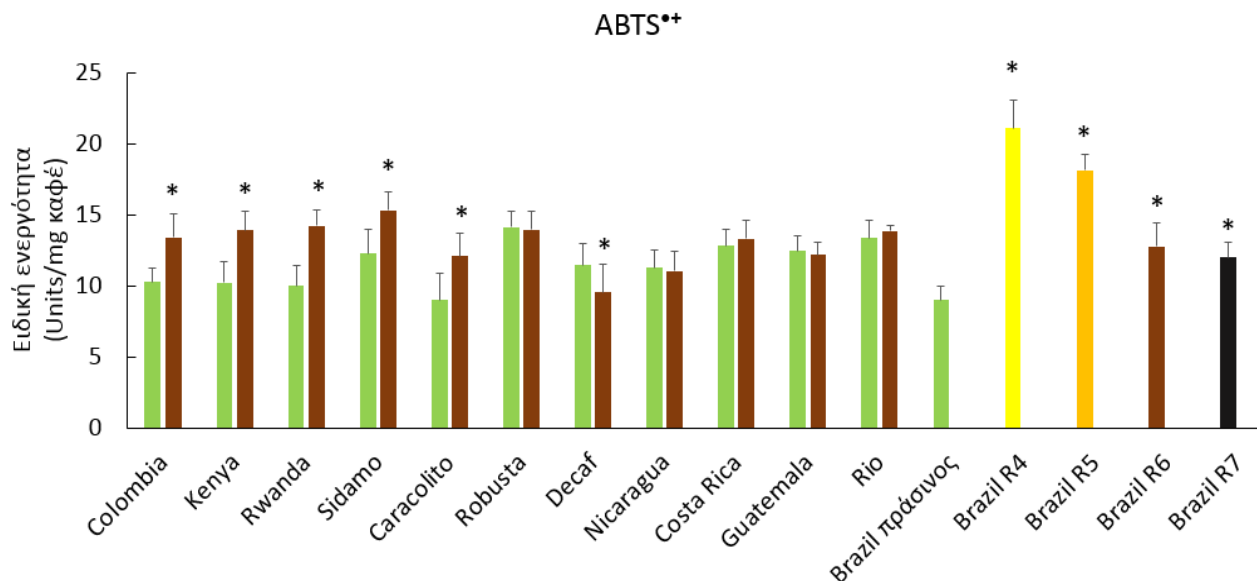


Διάγραμμα 2: Η ειδική ενεργότητα των εκχυλισμάτων καφέ σε units/mg καφέ στη δοκιμασία DPPH. Ένα unit αναφέρεται στην ποσότητα καφέ που απαιτείται για να εξουδετερωθεί η ρίζα κατά 50% (IC₅₀). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Ειδική μνεία στην ποικιλία Brazil όπου υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ειδικής ενεργότητας των πράσινων με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους κόκκους.

Η πρώτη μέθοδος που αφορούσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ ήταν η δοκιμασία εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH. Με βάση τα αποτελέσματα, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα με τιμές IC₅₀ μεταξύ 1,2 – 2,0 μL. Για να είναι δυνατή η σύγκρισή τους, οι τιμές IC₅₀ συμψηφίστηκαν με το πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάθε εκχυλίσματος (οι πολυφαινόλες θεωρούνται το ισχυρότερο βιοδραστικό συστατικό του καφέ) παράγοντας έτσι τις τιμές ειδικής ενεργότητας. Η τελευταία είχε εύρος από 5,45 units/mg καφέ για τον πράσινο Brazil που ήταν και ο λιγότερο δραστικός έως και 10,88 units/mg καφέ για τον Brazil R4 οποίος παρουσίασε την ισχυρότερη δραστηριότητα. Κατά μέσο όρο, τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων παρουσίασαν 7,23 ± 1,20 units/mg καφέ, ενώ τα αντίστοιχα καβουρδισμένα 8,15 ± 1,39 units/mg καφέ χωρίς αυτή η διαφορά των δυο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 7 από τις 12 ποικιλίες μεταξύ των πράσινων και των ψημένων εκχυλισμάτων. Στα 6 δείγματα το καβούρδισμα αύξησε την ενεργότητα του εκχυλίσματος ενώ σε μόνο ένα παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα, με το

πράσινο εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό. Αναλυτικότερα, τα καβουρδισμένα δείγματα των Colombia (24,1%), Kenya (35,1%), Rwanda (26%), Sidamo (15,2%), Caracolito (27,9%), Brazil R4 (99,6%)/R5 (87,9%)/R6 (46,2%)/R7 (32,8%) είχαν αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Αντίθετα το πράσινο εκχύλισμα του Decaf (26%) ήταν ισχυρότερο από το αντίστοιχο καβουρδισμένο.

2.2.3 Εξουδετέρωση ρίζας ABTS^{•+}

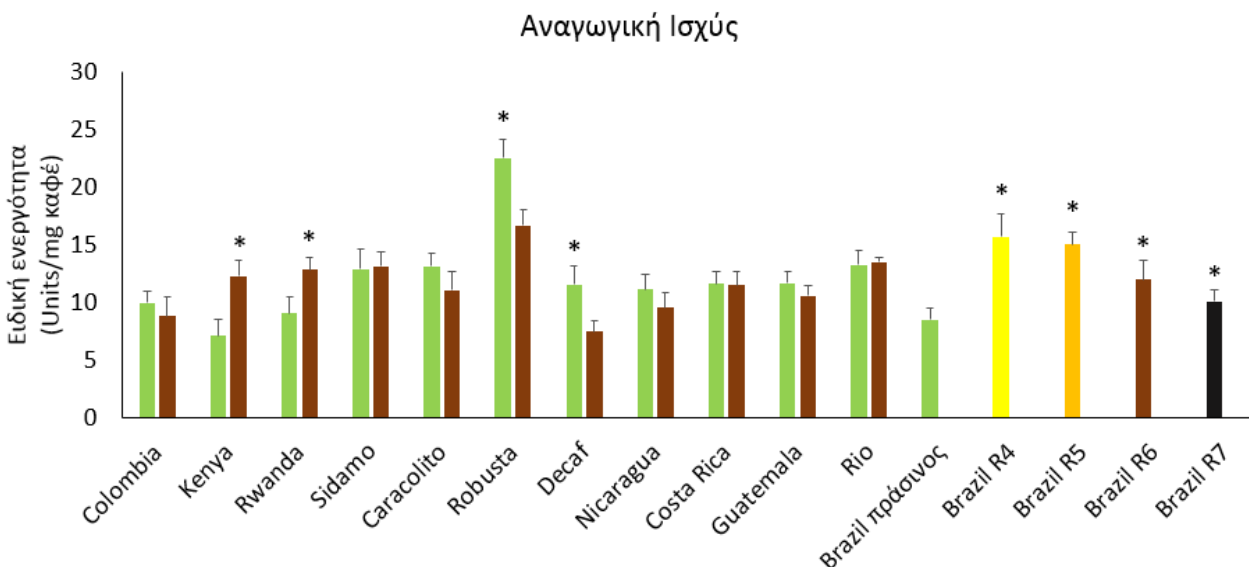


Διάγραμμα 3: Η ειδική ενεργότητα των εκχυλισμάτων καφέ σε units ανά mg καφέ στη δοκιμασία ABTS^{•+}. Ένα unit αναφέρεται στην ποσότητα καφέ που απαιτείται για να εξουδετερωθεί η ρίζα κατά 50% (IC₅₀). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Ειδική μνεία στην ποικιλία Brazil όπου υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ειδικής ενεργότητας των πράσινων με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους κόκκους.

Η δεύτερη δοκιμασία εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφορούσε την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS^{•+}. Τα εκχυλίσματα καφέ παρουσίασαν παρεμφερή δραστικότητα σε σχέση με τη δοκιμασία DPPH. Στο ABTS^{•+}, η ειδική ενεργότητα των δειγμάτων κυμάνθηκε από 8,97 units/mg καφέ για τον πράσινο Brazil, έως και 21,06 units/mg καφέ για το Brazil R4. Κατά μέσο όρο, τα πράσινα δείγματα είχαν $11,34 \pm 1,62$ units/mg καφέ, ενώ τα καβουρδισμένα $13,78 \pm 2,71$ units/mg καφέ με τη διαφορά των δυο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Συνολικά, όπως και στο DPPH, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 7 από τις 12 ποικιλίες μεταξύ των πράσινων και των ψημένων εκχυλισμάτων. Στα 6 δείγματα το καβούρδισμα αύξησε την ενεργότητα του εκχυλίσματος ενώ σε μόλις ένα είχαμε το αντίθετο

αποτέλεσμα, με το πράσινο εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό. Αναλυτικότερα, τα καβουρδισμένα δείγματα των Colombia (30,4%), Kenya (36,2%), Rwanda (42%), Sidamo (25,2%), Caracolito (34,1%), Brazil R4 (135%)/R5 (102%)/R6 (42,4%)/R7 (33,4%) είχαν αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Αντίθετα, το πράσινο εκχύλισμα του Decaf (16,4%) ήταν ισχυρότερο από το αντίστοιχο καβουρδισμένο.

2.2.4 Αναγωγική ισχύς

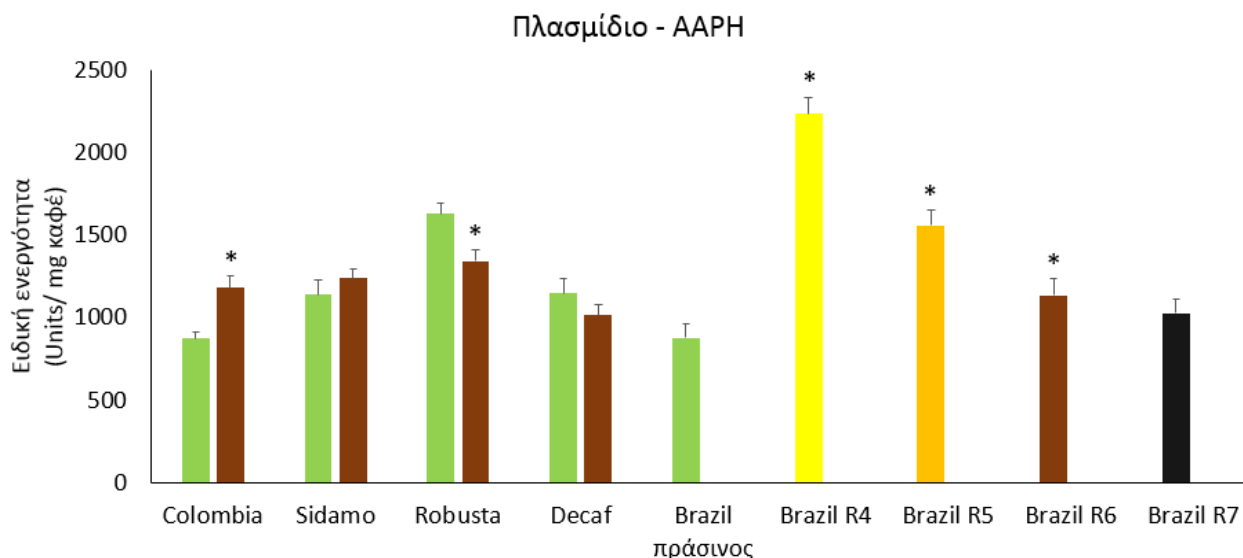


Διάγραμμα 4: Η ειδική ενεργότητα των εκχυλισμάτων καφέ σε units ανά mg καφέ στην δοκιμασία της Αναγωγικής ισχύος. Ένα unit αναφέρεται στην ποσότητα καφέ που απαιτείται για να φτάσει η απορρόφηση στην τιμή 0.5. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Ειδική μνεία στην ποικιλία Brazil όπου υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ειδικής ενεργότητας των πράσινων με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους κόκκους.

Η τρίτη δοκιμασία εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφορούσε την εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος τους. Διαφέρει ως προς τις δυο προηγούμενες καθώς δεν εξουδετερώνεται κάποια ρίζα, αλλά αποτιμάται η ικανότητα των περιεχόμενων ουσιών του εκχυλίσματος να δρουν αναγωγικά. Η ειδική ενεργότητα των δειγμάτων κυμάνθηκε από 7,12 units/mg καφέ για τον πράσινο Kenya, έως και 22,52 units/mg καφέ για τον πράσινο Robusta. Κατά μέσο όρο, τα πράσινα δείγματα είχαν $11,88 \pm 3,69$ units/mg καφέ, ενώ τα καβουρδισμένα $12,02 \pm 2,48$ units/mg καφέ, χωρίς η διαφορά των δυο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 5 από τις 12 ποικιλίες μεταξύ των πράσινων και των ψημένων εκχυλισμάτων. Στα 3 δείγματα το καβούρδισμα αύξησε την ενεργότητα του

εκχυλίσματος ενώ σε δύο παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα, με το πράσινο εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό. Αναλυτικότερα, τα καβουρδισμένα δείγματα των Kenya (72,7%), Rwanda (41,3%), Brazil R4 (84,7%)/R5 (76,9%)/R6 (41,1%)/R7 (18,8%) είχαν αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Αντίθετα το πράσινο εκχύλισμα του Robusta (35,1%) και του Decaf (54,1%) ήταν ισχυρότερα από τα αντίστοιχα καβουρδισμένα.

2.2.5 Αναστολή της επαγόμενης από το AAPH - πλασμιδιακής χαλάρωσης



Διάγραμμα 5: Η ειδική ενεργότητα των εκχυλισμάτων καφέ σε units ανά mg καφέ στην δοκιμασία πλασμιδιακής χαλάρωσης λόγω AAPH. Ένα unit αναφέρεται στην ποσότητα καφέ που απαιτείται για να εξουδετερωθεί η δραστικότητα της ρίζας κατά 50% (IC₅₀). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Ειδική μεία στην ποικιλία Brazil όπου υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ειδικής ενεργότητας των πράσινων με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους κόκκους.

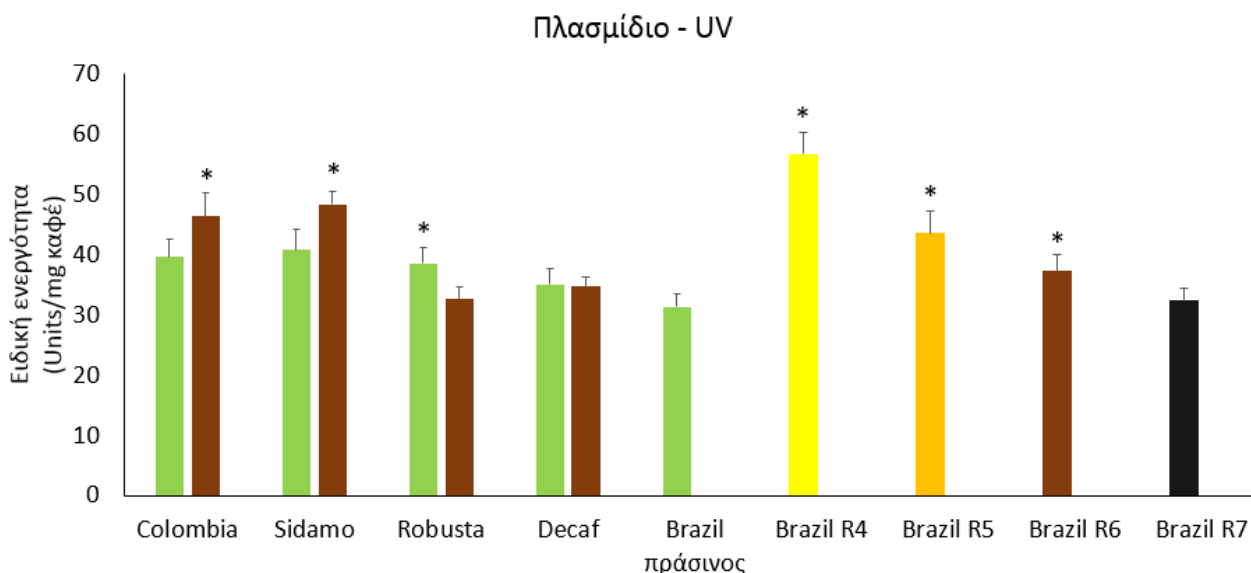
Η τέταρτη δοκιμασία αφορούσε την προστατευτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, εκτιμώντας την ικανότητα τους να παρεμποδίσουν τις επαγόμενες από το AAPH μονόκλωνες ρήξεις του DNA.

Συνολικά, επιλέχθηκαν 5 ποικιλίες από τις 12 για περαιτέρω μελέτη και συγκεκριμένα δύο (Colombia και Sidamo) στις οποίες το καβούρδισμα είχε θετική επίδραση στη δραστικότητα, δύο (Robusta και Decaf) στις οποίες το καβούρδισμα μείωσε τη δραστικότητα, καθώς και την ποικιλία Brazil που είχε 4 χρόνους καβουρδίσματος.

Η ειδική ενεργότητα των δειγμάτων κυμαινόταν από 873 units/mg καφέ για τον πράσινο Colombia, έως και 2239 units/mg καφέ για τον Brazil R4. Κατά μέσο όρο, τα πράσινα δείγματα

είχαν 1135 ± 275 units/mg καφέ, ενώ τα καβουρδισμένα 1344 ± 376 units/mg καφέ, χωρίς η διαφορά των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 3 από τις 5 ποικιλίες μεταξύ των πράσινων και των ψημένων εκχυλισμάτων. Στα 2 δείγματα το καβούρδισμα αύξησε την ενεργότητα του εκχυλίσματος ενώ σε μία είχαμε το αντίθετο αποτέλεσμα, με το πράσινο εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό. Αναλυτικότερα, τα καβουρδισμένα δείγματα των Colombia (35,6%), Brazil R4 (154%)/R5 (77,4%)/R6 (29,2%) είχαν αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Αντίθετα το πράσινο εκχύλισμα του Robusta (21,1%) ήταν ισχυρότερο από το αντίστοιχο καβουρδισμένο.

2.2.6 Αναστολή της επαγόμενης από την ακτινοβολία UV-πλασμιδιακής χαλάρωσης



Διάγραμμα 6: Η ειδική ενεργότητα των εκχυλισμάτων καφέ σε units ανά mg καφέ στην δοκιμασία πλασμιδιακής χαλάρωσης λόγω ακτινοβολίας UV. Ένα unit αναφέρεται στην ποσότητα καφέ που απαιτείται για να εξουδετερωθεί η δραστηριότητα της ακτινοβολίας κατά 50% (IC₅₀). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι πράσινοι κόκκοι και με καφέ οι καβουρδισμένοι. Ειδική μεία στην ποικιλία Brazil όπου υπάρχουν 4 διαφορετικά χρώματα αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος (κάθε τιμή R αντιστοιχεί στα λεπτά καβουρδίσματος). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ειδικής ενεργότητας των πράσινων με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους κόκκους.

Η πέμπτη και τελευταία δοκιμασία αφορούσε την προστατευτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, εκτιμώντας την ικανότητα τους να παρεμποδίσουν τις επαγόμενες από το UV μονόκλωνες ρήξεις του DNA.

Όπως και στην προηγούμενη δοκιμασία, επιλέχθηκαν 5 ποικιλίες από τις 12 για περαιτέρω μελέτη, δύο (Colombia και Sidamo) στις οποίες το καβούρδισμα είχε θετική επίδραση στη

δραστικότητα, δύο (Robusta και Decaf) στις οποίες το καβούρδισμα μείωσε τη δραστηριότητα, καθώς και την ποικιλία Brazil που είχε 4 χρόνους καβουρδίσματος.

Η ειδική ενεργότητα των δειγμάτων κυμαινόταν από 31,32 units/mg καφέ για τον πράσινο Brazil, έως και 56,73 units/mg καφέ για τον Brazil R4. Κατά μέσο όρο, τα πράσινα δείγματα είχαν $37,07 \pm 3,44$ units/mg καφέ, ενώ τα καβουρδισμένα $40,98 \pm 8,53$ units/mg καφέ, χωρίς η διαφορά των δυο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 4 από τις 5 ποικιλίες μεταξύ των πράσινων και των ψημένων εκχυλισμάτων. Στα 3 δείγματα το καβούρδισμα αύξησε την ενεργότητα του εκχυλίσματος ενώ σε μία παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα, με το πράσινο εκχύλισμα να είναι πιο δραστικό. Αναλυτικότερα, τα καβουρδισμένα δείγματα των Colombia (17%), Sidamo (18,6%), Brazil R4 (81,1%)/R5 (39%)/R6 (18,9%) είχαν αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Αντίθετα το πράσινο εκχύλισμα του Robusta (18,4%) ήταν ισχυρότερο από το αντίστοιχο καβουρδισμένο.

2.2.7 Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών

Μετά τη συγκέντρωση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ τους. Αρχικά, εξετάστηκαν οι συσχετίσεις μόνο για τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 4: Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στους πράσινους κόκκους

	Folin-Ciocalteu	DPPH*	ABTS ⁺⁺	Αναγωγική Ισχύς	Πλασμίδιο - AAPH
DPPH*	0,657*	-	0,951**	0,629*	-
ABTS ⁺⁺	0,790**	0,951**	-	0,692*	-
Αναγωγική Ισχύς	0,580*	0,629*	0,692*	-	-
Πλασμίδιο - AAPH	0,900*	-	-	-	-
Πλασμίδιο - UV	-	-	-	-	-

*: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,05$

** : Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,01$

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είχε ισχυρή θετική συσχέτιση (από 0,580-0,900) με όλες τις δοκιμασίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκτός της πλασμιδιακής χαλάρωσης λόγω UV, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πολυφαινόλες είναι

κατεξοχήν τα μόρια στα οποία οφείλονται οι παρατηρούμενες ευεργετικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων.

Επιπλέον, το DPPH' είχε στατιστικά σημαντική θετική και πολύ ισχυρή συσχέτιση μόνο με το ABTS⁺⁺ (0,951) και μέτρια με την αναγωγική ισχύ (0,629), χωρίς να έχει σχέση με τις δύο πλασμιδιακές δοκιμασίες. Το ABTS⁺⁺ παρουσίασε μέτρια θετική συσχέτιση με την αναγωγική ισχύ (0,692), ενώ οι δυο πλασμιδιακές δοκιμασίες δεν παρουσίασαν κάποια συσχέτιση με τις υπόλοιπες μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης.

Στο δεύτερο βήμα, εκτιμήθηκαν οι συσχετίσεις που αφορούσαν τα εκχυλίσματα μόνο των καβουρδισμένων κόκκων, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 5: Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στους καβουρδισμένους κόκκους

	Folin-Ciocalteu	DPPH'	ABTS ⁺⁺	Αναγωγική Ισχύς	Πλασμίδιο - AAPH
DPPH'	0,525*	-	0,850**	0,689**	0,929**
ABTS ⁺⁺	0,786**	0,850**	-	0,854**	0,976**
Αναγωγική Ισχύς	0,775**	0,689**	0,854**	-	0,857**
Πλασμίδιο - AAPH	0,762*	0,929**	0,976**	0,857**	-
Πλασμίδιο - UV	0,548*	0,762*	0,762*	-	0,786**

*: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,05$

** : Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,01$

Με βάση τα αποτελέσματα, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είχε θετική συσχέτιση (από 0,525-0,786) με όλες τις δοκιμασίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι και στα καβουρδισμένα εκχυλίσματα οι πολυφαινόλες είναι κατεξοχήν τα μόρια στα οποία οφείλονται οι παρατηρούμενες ευεργετικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων.

Επιπρόσθετα, το DPPH' είχε επίσης στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση με όλες τις δοκιμασίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (από 0,689 έως 0,929). Το ABTS⁺⁺ παρουσίασε εξίσου θετική και ισχυρή συσχέτιση με όλες τις δοκιμασίες (από 0,762 έως 0,976). Η αναγωγική ισχύς είχε επίσης ισχυρή θετική συσχέτιση με όλες τις δοκιμασίες (από 0,689 έως 0,857), πλην της πλασμιδιακής χαλάρωσης λόγω ακτινοβολίας UV. Το AAPH είχε και αυτό θετική και ισχυρή συσχέτιση με όλες τις υπόλοιπες δοκιμασίες (από 0,762 έως 0,976) ενώ τέλος το UV συσχετίστηκε θετικά και ισχυρά με όλες τις δοκιμασίες (από 0,762 έως 0,786) πλην της αναγωγικής ισχύος όπως αναφέρθηκε.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών χρησιμοποιώντας όλα τα εκχυλίσματα (τόσο τα πράσινα όσο και τα ψημένα), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών στο σύνολο των εκχυλισμάτων

	Folin-Ciocalteu	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	Αναγωγική Ισχύς	Πλασμίδιο - AAPH
DPPH [•]	0,581 ^{**}	-	0,905 ^{**}	0,699 ^{**}	0,918 ^{**}
ABTS ^{•+}	0,729 ^{**}	0,905 ^{**}	-	0,745 ^{**}	0,918 ^{**}
Αναγωγική Ισχύς	0,749 ^{**}	0,699 ^{**}	0,745 ^{**}	-	0,841 ^{**}
Πλασμίδιο - AAPH	0,775 ^{**}	0,918 ^{**}	0,918 ^{**}	0,841 ^{**}	-
Πλασμίδιο - UV	0,604 [*]	0,764 ^{**}	0,736 ^{**}	0,610 [*]	0,791 ^{**}

*: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,05$

** : Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,01$

Με βάση τα αποτελέσματα, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες παρουσίασε στατιστικά σημαντική μέτρια έως και ισχυρή θετική συσχέτιση με όλες τις δοκιμασίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (από 0,581 έως 0,775), υπογραμμίζοντας τη σημασία των ενώσεων αυτών στον καθορισμό της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων. Επιπρόσθετα, όλες οι υπόλοιπες δοκιμασίες συσχετίστηκαν από μέτρια έως και πολύ ισχυρά μεταξύ τους, στατιστικά σημαντικά.

2.3 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ερευνών σχετικά με την πιθανή βιοδραστικότητα συστατικών της καθημερινής διατροφής (110,137,138). Σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκε ο καφές στην παρούσα διατριβή. Όπως αναφέρθηκε, η κατανάλωση καφέ είναι μία καθημερινή συνήθεια του σημερινού ανθρώπου. Δεδομένου ότι είναι ένα προϊόν φυτικής προέλευσης, περιέχει πληθώρα βιοδραστικών ουσιών με προεξέχουσες τις πολυφαινόλες και δη τα χλωρογενικά οξέα. Επιπλέον, ανάλογη δράση αποδίδεται και στην καφεΐνη (το πλέον γνωστό συστατικό του), σε κάποια διτερπένια και στις μελανοϊδίνες (που υπάρχουν στον καβουρδισμένο καφέ). Ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία και πιο συγκεκριμένα μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης ή/και προστασία έναντι διάφορων παθολογικών καταστάσεων έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες (29,139,140). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έχουν παρατηρήσει κάποια ευεργετική επίδραση της κατανάλωσης καφέ (141). Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη σύστασή του κυριότεροι εκ των οποίων είναι η προέλευση και η επεξεργασία του φυτού μέχρι την παραγωγή του αντίστοιχου ροφήματος. Το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στη σύσταση του καφέ σε φυτοχημικές ενώσεις ανάλογα με τη προέλευση, το είδος και την επεξεργασία που υφίστανται λόγω καβουρδίσματος, καθιστά σημαντική τη διεξαγωγή ερευνών σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα διάφορα ροφήματα καφέ. Η εκτίμηση της βιοδραστικότητας ενός εκχυλίσματος ξεκινά από τον *in vitro* χαρακτηρισμό του με την πραγματοποίηση ενός συνόλου δοκιμασιών και την εκτίμηση πολλών βιοδεικτών (142).

Συνολικά, κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας εργασίας εξετάστηκαν εκχυλίσματα από 12 ποικιλίες καφέ προερχόμενες από διάφορες χώρες. Επρόκειτο τόσο για πράσινους όσο και για καβουρδισμένους κόκκους (σε μια ποικιλία μάλιστα εξετάστηκαν 4 διαφορετικοί χρόνοι ψησίματος) από τα δύο κύρια εμπορικά είδη καφέ (*C. arabica* και *C. canephora*), ενώ ελέγχθηκε και ένα αποκαφεϊνοποιημένο χαρμάνι από κόκκους *C. arabica*.

Το πρώτο βήμα ήταν η παρασκευή εκχυλισμάτων από τους κόκκους. Στη συνέχεια αποτιμήθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάθε εκχυλίσματος με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Οι πολυφαινόλες, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (βλέπε [1.8.2.5](#)), είναι βιοδραστικές ενώσεις που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών, στις οποίες έχουν αποδοθεί οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν αρκετά φυτικά εκχυλίσματα (115,143). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα περιείχαν κατά μέσο όρο 38,98 μg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE)/ mg καφέ. Ο αριθμός αυτός δεν

απέχει από αντίστοιχα αποτελέσματα που απαντώνται στη σχετική βιβλιογραφία σχετικά με την περιεκτικότητα του καφέ σε πολυφαινόλες. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα 1,5-32,5 mg χλωρογενικών οξέων (που είναι η κύρια πολυφαινολική ομάδα στον καφέ) ανά γραμμάριο καφέ σε διάφορα είδη (144). Επιπρόσθετα, σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι αντιστοιχούν περίπου 35-140 μg CGA ανά γραμμάριο καφέ στους πράσινους κόκκους ωστόσο αποικοδομείται (ή ενσωματώνεται στις μελανοΐδινες) μέρος αυτών με το καβούρδισμα (145).

Θεωρητικά ένα μέρος των πολυφαινολών του καφέ αποικοδομούνται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, ωστόσο αυτό δεν ήταν εμφανές στην πλειονότητα των εκχυλισμάτων της παρούσης μελέτης. Αναλυτικότερα, μόνο σε 3 από τις 12 ποικιλίες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μικρότερη ποσότητα πολυφαινολών στο εκχύλισμα που προερχόταν από καβουρδισμένους κόκκους και συγκεκριμένα στα δείγματα Robusta, Decaf και μόνο στο πιο καβουρδισμένο από τα 4 Brazil (R7). Αντιθέτως, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως με το καβούρδισμα τα χλωρογενικά οξέα μειώνονται σε πολύ μεγάλο βαθμό (119,146,147). Αυτή η μείωση δε σημαίνει απαραίτητα ότι καταστρέφονται πλήρως, καθώς μπορούν είτε να μετατραπούν στις αντίστοιχες λακτόνες, να διασπαστούν στα επιμέρους μονομερή είτε και να ενσωματωθούν σε μακρομοριακές δομές που ονομάζονται μελανοΐδινες. Και τα τρία αυτά γεγονότα θα είχαν σαν αποτέλεσμα τη φαινομενική μείωση των χλωρογενικών οξέων, δίχως όμως να μειώνονται τόσο δραστικά και τα πολυφαινολικά μόρια στο σύνολό τους (όπως και αποτιμώνται από την μέθοδο Folin-Ciocalteu).

Ακολούθως, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε εκχυλίσματος με τη βοήθεια 5 δοκιμασιών. Οι δυο πρώτες (DPPH[•] και ABTS^{•+}) αφορούσαν την εξουδετέρωση τεχνητών ριζών, η τρίτη (Αναγωγική ισχύς) την αναγωγική ικανότητα ενώ οι δύο τελευταίες τη δυνατότητα αναστολής μονόκλωνων ρήξεων στο DNA που προκαλούνται είτε από μια ρίζα (AAPH) είτε από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του DPPH[•] και του ABTS^{•+}, τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας τις δυο αυτές ρίζες. Μάλιστα, τα αποτελέσματα αυτά είχαν πολύ ισχυρή θετική συσχέτιση, γεγονός που υποδηλώνει πως παρά τη διαφορετική δομή τους και οι δυο ρίζες εξουδετερώνονται από τα μόρια των εκχυλισμάτων καφέ. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τις πειραματικές διαδικασίες, τα εκχυλίσματα καφέ αλληλεπιδρούν είτε με 100 μM DPPH[•], είτε με 1mM ABTS^{•+}, ενώ συνδυάζοντας αυτό το δεδομένο με τα αποτελέσματα, όπου η ειδική ενεργότητα έχει περίπου διπλάσιες τιμές για το ABTS^{•+}, γίνεται εύκολα κατανοητό

πως τα αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ αλληλεπιδρούν και εξουδετερώνουν με μεγαλύτερη ευκολία τη ρίζα ABTS^{•+}. Σε αυτό είναι πιθανό να συμβάλλει ο διαλύτης της εκάστοτε μεθόδου καθώς στο μεν DPPH[•] χρησιμοποιείται μεθανόλη ενώ στο ABTS^{•+} dH₂O (148). Και οι δυο αυτές ρίζες δεν απαντώνται φυσιολογικά στα βιολογικά συστήματα και μπορούν να εξουδετερωθούν μέσω δύο μηχανισμών, της μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) ή της μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET). Ένα πιθανό πρόβλημα πηγάζει από το μεγάλο τους μέγεθος συγκριτικά με φυσιολογικές δραστικές μορφές, γεγονός που δυσχεραίνει την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των αντιοξειδωτικών λόγω στερικής παρεμπόδισης (149,150). Η χρήση, ωστόσο, αυτών των δοκιμασιών προσφέρει ένα γρήγορο, εύκολο και απλό τρόπο εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων και παρατηρείται σε πλήθος σχετικών μελετών στη βιβλιογραφία (25,151–153).

Και στις δυο δοκιμασίες το καβούρδισμα είχε θετική επίδραση σε 6 από τις 12 ποικιλίες (και μάλιστα ακριβώς στις ίδιες) και αρνητική μόλις σε δύο στο DPPH[•] και μία στο ABTS^{•+} (το χαρμάνι Decaf). Επιπρόσθετα, η χωρίς καφεΐνη ποικιλία στην οποία το ψήσιμο μείωσε τη δραστικότητα επέδειξε και στατιστικά σημαντικά μειωμένη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μετά το καβούρδισμα. Αντιθέτως, οι άλλες δύο ποικιλίες στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες μετά το ψήσιμο (Robusta και Brazil R7) είτε δεν είχαν διαφορά (Robusta, μεταξύ της δραστικότητας πράσινου και ψημένου καφέ) είτε το καβουρδισμένο δείγμα είχε ισχυρότερη δραστικότητα σε σχέση με το αντίστοιχο πράσινο (Brazil R7) στα DPPH[•] και ABTS^{•+}. Ο συνδυασμός αυτών των δεδομένων υποδεικνύει και τη σημασία όχι μόνο της ποσότητας πολυφαινολών αλλά και της ποιοτικής σύστασης, που μπορεί να διαφέρει μεταξύ δειγμάτων διαφορετικού είδους (*C. arabica* vs *C. canephora*) είτε να έχουν διαφορετική προέλευση.

Το εκχύλισμα με την μεγαλύτερη δραστικότητα ήταν το ελαφρά ψημένο Brazil (R4), κάτι που έχει παρατηρηθεί και στη βιβλιογραφία, καθώς σε παλιότερες μελέτες που εξέτασαν τη σχέση καβουρδίσματος/δραστικότητας του καφέ είχε βρεθεί πως το μέτριο ψήσιμο συγκριτικά με τα πιο έντονα ψησίματα, παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (154,155).

Η τρίτη δοκιμασία εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφορούσε την αναγωγική ισχύ των εκχυλισμάτων που υπολογίστηκε με βάση την ικανότητά τους να ανάγουν το σίδηρο. Η συγκεκριμένη τεχνική αν και δε μελετά την απευθείας εξουδετέρωση μίας ρίζας, σχετίζεται με την αναγωγική δράση καθώς φανερώνει την ικανότητα των ενώσεων ενός εκχυλίσματος να δράσουν

ως ηλεκτρονιοδότες. Επομένως, εκχυλίσματα με ισχυρή αναγωγική ικανότητα θα μπορούσαν να μειώσουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που παρατηρούνται κατά τη διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων, ενεργώντας έτσι είτε ως πρωτογενή είτε ως δευτερογενή αντιοξειδωτικά (156). Τα αποτελέσματα διέφεραν σε σχέση με τις προηγούμενες δύο καθώς μόλις 3 ποικιλίες (Kenya, Rwanda και Brazil R4/5/6/7) είχαν αυξημένη δραστηριότητα μετά το ψήσιμο, ενώ δύο είχαν μειωμένη (Robusta και Decaf, οι ίδιες δύο στις οποίες μειώθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο). Η συγκεκριμένη δοκιμασία είχε και την ισχυρότερη θετική συσχέτιση με το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων στο σύνολο των δειγμάτων (0,749), υπογραμμίζοντας την ικανότητα των συγκεκριμένων μορίων να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τη σημασία του να αποτιμάται συνδυαστικά μια πληθώρα βιοδεικτών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος και την επιλογή των πιο δραστικών για την περαιτέρω μελέτη τους.

Κατ' αυτό τον τρόπο επιλέχθηκαν τα εκχυλίσματα των Colombia, Sidamo, Robusta, Decaf και Brazil ώστε να εξεταστούν ως προς την ικανότητα να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνες ρήξεις προκαλούμενες από το AAPH ή από την ακτινοβολία UV. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν προστατευτική δράση ενώ αξίζει να σημειωθεί πως ήταν πολύ πιο αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση της ρίζας AAPH συγκριτικά με την ρίζα υδροξυλίου που δημιουργείται λόγω της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο, καθώς η ρίζα υδροξυλίου είναι μία από τις ισχυρότερες και πλέον δραστικές που δημιουργούνται στον οργανισμό λόγω του ελάχιστου χρόνου ημιζωής της (45,157). Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύσουν το DNA μπορεί να θεωρηθεί και ως αντιμεταλλαξιγόνος, καθώς τα μονόκλωνα σπασίματα είναι καθοριστικά για την πρόκληση μεταλλάξεων (158). Υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία σχετικά με την ικανότητα φυτικών εκχυλισμάτων να δράσουν προστατευτικά για το DNA, αποτρέποντας την προκαλούμενη από ρίζες μεταλλαξιγένεση (159–162). Έτσι, η αλληλεπίδραση μίας ρίζας (και κυρίως της ρίζας υδροξυλίου) με τους άνθρακες 3, 4 ή 5 της σακχαρικής ομάδας μίας αζωτούχας βάσης του DNA είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνη για την πρόκληση ρήξεων. Άρα, είναι πιθανό η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων να βασίζεται στην παρεμπόδιση αυτής της αλληλεπίδρασης (163). Επιπρόσθετα, η υπερϊώδης ακτινοβολία προκαλεί την παραγωγή ριζών υδροξυλίου και θεωρείται ένας ισχυρός παράγοντας πρόκλησης βλαβών του δέρματος όπως το μελάνωμα (164). Συνεπώς, η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να εξουδετερώνουν τις βλαβερές επιδράσεις της υπερϊώδους ακτινοβολίας συνιστά μια

ενδιαφέρουσα παρατήρηση, καθώς θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή παραγόντων για την αποτροπή των προκαλούμενων βλαβών από αυτή. Εκτός αυτού, οι ρίζες περοξυλίου (όπως είναι από δομικής άποψης το AAPH) θεωρούνται κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για τη λιπιδική υπεροξειδωση, έτσι ουσίες ή εκχυλίσματα που τις εξουδετερώνουν πιθανότατα να εμφανίζουν και προστατευτική δράση έναντι της οξειδωσης των λιπιδίων (39).

Το ισχυρότερο εκχύλισμα και στις δυο αυτές δοκιμασίες ήταν το ελαφρά καβουρδισμένο της ποικιλίας Brazil (R4). Κατ' αυτόν τον τρόπο είδαμε πως αν και δεν ήταν το εκχύλισμα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, παρουσίασε την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Έτσι είναι εμφανές ότι ναι μεν η ποσότητα πολυφαινόλων είναι καθοριστική για την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος, ωστόσο εξίσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και άλλοι παράγοντες, όπως η ποιοτική σύσταση που μπορεί να διαφέρει από είδος σε είδος καθώς και ο βαθμός καβουρδίσματος στην περίπτωση του καφέ.

Συνολικά, όλα τα εκχυλίσματα καφέ παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έναντι πληθώρας οξειδωτικών μορίων. Με βάση τους πίνακες συσχέτισης φάνηκε μια καθαρή σχέση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης σε όλες τις δοκιμασίες, ενώ υπήρξε θετική συσχέτιση και μεταξύ όλων των δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν. Οι διαφορές στο επίπεδο συσχέτισης του πολυφαινολικού περιεχομένου με τις υπόλοιπες δοκιμασίες (από 0,581 έως και 0,775) φανερώνει πως αναλόγως του οξειδωτικού παράγοντα, παρατηρείται και διαφορετική ικανότητα αλληλεπίδρασης και εξουδετέρωσής του από τις πολυφαινόλες. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι στον καφέ το πολυφαινολικό περιεχόμενο συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα (25). Τα ανωτέρω αποτελέσματα έδωσαν μια εικόνα σχετικά με τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων καφέ, προετοιμάζοντας το δεύτερο στάδιο της διατριβής που αφορούσε την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού δράσης των πιο ισχυρών. Επιπρόσθετα, η παρουσιαζόμενη ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν δραστικές μορφές είναι πιθανό να συνεισφέρει στην πιθανή ευεργετική επίδραση που έχει η κατανάλωση του ροφήματος καφέ έναντι σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες παθολογικών καταστάσεων.

Καθώς παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών, επιλέχθηκαν οι πιο αντιπροσωπευτικές για περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού δράσης τους. Πιο συγκεκριμένα, έγινε επιλογή της ποικιλίας Brazil καθώς παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η σχέση της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων με βάση τον βαθμό καβουρδίσματός τους ενώ ήταν αξιοσημείωτη η αντιοξειδωτική ικανότητα του ελαφρά καβουρδισμένου εκχυλίσματος R4 που ήταν το πλέον

δραστικό. Ακόμα, επιλέχθηκε το εκχύλισμα Robusta το οποίο ανήκει σε διαφορετικό είδος καφέ συγκριτικά με τα υπόλοιπα (*C. canephora* έναντι *C. arabica*) ενώ ταυτόχρονα το πράσινο εκχύλισμά του ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και τη μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ. Τέλος, η τρίτη ποικιλία καφέ που επιλέχθηκε ήταν η χωρίς καφεΐνη, καθώς ήταν σημαντικό να μελετηθεί η πιθανή επιρροή της έλλειψης καφεΐνης στις ευεργετικές ιδιότητες του καφέ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων

Στο δεύτερο στάδιο της διατριβής, τρεις ποικιλίες από τις αρχικές 12 μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Ακόμα, εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση τους καθώς και η ικανότητα εξουδετέρωσης φυσιολογικά παραγόμενων ελευθέρων ριζών (συγκριτικά με τις τεχνητές ρίζες του προηγούμενου κεφαλαίου) καθώς και η ικανότητα αναστολής ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα. Οι τρεις ποικιλίες ήταν:

1. Η Brazil (με τους 4 χρόνους καβουρδίσματος)
2. Η Robusta (καθώς είναι το δεύτερο κύριο εμπορικό είδος καφέ)
3. Η Ντεκαφεϊνέ (για να εξεταστεί η επίδραση της αποκαφεϊνοποίησης)

Επιπρόσθετα, το πιο ισχυρό καβουρδισμένο εκχύλισμα καθώς και το αντίστοιχο πράσινο εξετάστηκαν ως προς την επίδραση στα επίπεδα έκφρασης ενζύμων (σε μυοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα) που σχετίζονται με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Το σύνολο των ανωτέρω δεδομένων προσέφεραν στοιχεία για τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης των εκχυλισμάτων καφέ στα κύτταρα, επιτρέποντας την καλύτερη κατανόηση της πιθανής επίδρασης που μπορεί να έχει η κατανάλωση καφέ από τον άνθρωπο.

3.1 Υλικά και μέθοδοι

3.1.1 Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926

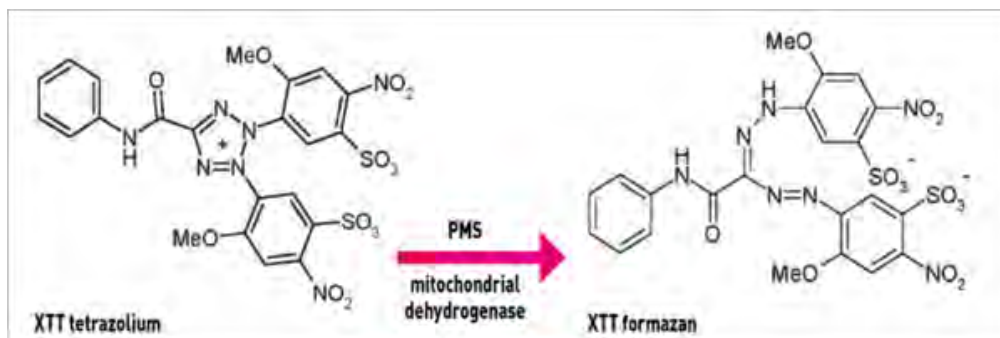
Εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων καφέ σε μυοβλάστες ποντικού (C2C12) και ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926). Τα C2C12 είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά προερχόμενη από τα δορυφορικά κύτταρα του μηρού ποντικών 70 ώρες μετά από τραυματισμό (165). Τα EA.hy926 αποτελούν υβριδική σειρά έπειτα από σύντηξη δύο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, των ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVECs) και των επιθηλιακών κυττάρων από πνευμονικό καρκίνωμα (A549) (166).

Και οι δυο κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε φλάσκες εμβαδού 25 ή 75 cm², παρουσία θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), εμπλουτισμένου με ορό βοδινού (FBS, 10%), L-γλουταμίνη (1%) και διάλυμα αντιβιοτικού/αντιμυκητιακού (1%) σε κλίβανο υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν έως ότου καλύψουν το 80% της φλάσκας και μετά πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια. Για τη διαδικασία αυτή απαιτούνταν αποκόλληση των κυττάρων μέσω θρυψίνης (0,25%) για 5 min στους 37°C. Ακολούθως η δράση της σταματούσε με την προσθήκη DMEM με FBS και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέες φλάσκες ώστε να καλύπτουν το 20% (C2C12) ή το 33% (EA.hy926) της επιφάνειας. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνταν σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων. Αξίζει να σημειωθεί πως σε τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν έλεγχοι για τη διάγνωση πιθανών επιμολύνσεων.

3.1.2 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του καφέ με τη μέθοδο XTT

Καθώς σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η επίδραση του καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, έπρεπε αρχικά να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που το κάθε εκχύλισμα εμφάνιζε κυτταροτοξικότητα σε κάθε σειρά. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία XTT (Roche).

Πρόκειται για μία χρωματομετρική δοκιμή που ποσοτικοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα και βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη έχει πορτοκαλί χρώμα και μέγιστο απορρόφησης στα 450 nm. Η τοξική επίδραση κάποιου εκχυλίσματος μεταφράζεται σε μείωση της παρατηρούμενης απορρόφησης.



Εικόνα 23: Μετατροπή του XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη

Αναλυτικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τη φλάσκα με τη βοήθεια θρυψίνης και καταμετρήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Εν συνεχεία, 10^4 κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κάθε πηγαδάκι τριβλίου 96 θέσεων, προστέθηκε DMEM (που περιείχε FBS) και επώστηκαν για 24 ώρες στους 37°C . Ακολούθως το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από νέο που περιείχε αντί για FBS τις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος καφέ (η απουσία FBS δικαιολογήθηκε από την πιθανή αλληλεπίδραση των συστατικών του με αυτά του εκχυλίσματος) και επώστηκαν για επιπλέον 24 ώρες στους 37°C . Τέλος, ακολουθούθησε η προσθήκη του αντιδραστηρίου XTT, επώαση για 4 ώρες στους 37°C , φωτομέτρηση στα 450 και 630 nm σε ELISA plate reader και ποσοτικοποίηση με τη χρήση του λογισμικού Gen5. Η μέτρηση στα 630 nm πραγματοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των τιμών μεταξύ των διαφορετικών πηγαδιών του τριβλίου, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος δεν απορροφά η φορμαζάνη. Οι τιμές των 630 nm αφαιρέθηκαν από τις απορροφήσεις των 450 nm. Κάθε πείραμα περιείχε και μάρτυρες στους οποίους δεν προστέθηκε εκχύλισμα καφέ στα κύτταρα, ενώ κάθε συγκέντρωση καφέ είχε και το αντίστοιχο τυφλό, στο οποίο δεν προστέθηκαν κύτταρα προκειμένου να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που οφείλεται μόνο στο θρεπτικό μέσο ή/και το εκχύλισμα. Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα για κάθε εκχύλισμα και κάθε συγκέντρωση εξετάζοντας σε τριπλέτες. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από την επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ (έπειτα από αφαίρεση της απορρόφησης των τυφλών) προσδιορίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{(\text{Abs μάρτυρα} - \text{Abs δείγματος})}{\text{Abs μάρτυρα}} \times 100\%$$

Abs μάρτυρα: Η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

3.1.3 Χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ στις δυο κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες εμβαδού 25 cm² για να προσδιοριστούν τα ενδογενή επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και 75 cm² για τον υπολογισμό των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) και της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (CARB). Αρχικά, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία DMEM και FBS στους 37°C. Ακολούθως, το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με νέο που αντί για FBS περιείχε τις 4 μέγιστες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος καφέ (με βάση την κυτταροτοξικότητα που προέκυψε από τη δοκιμασία XTT). Έπειτα από εκ νέου επώαση για 24 ώρες στους 37°C, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (300g, 10 min, 4°C) ξεπλύθηκαν με PBS και ξαναφυγοκεντρήθηκαν. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε PBS και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των GSH και ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής, ενώ για τα TBARS και τα CARB πραγματοποιήθηκε λύση με υπερήχους για 1 min (70% amplitude, 0,7 sec κύκλος).

3.1.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

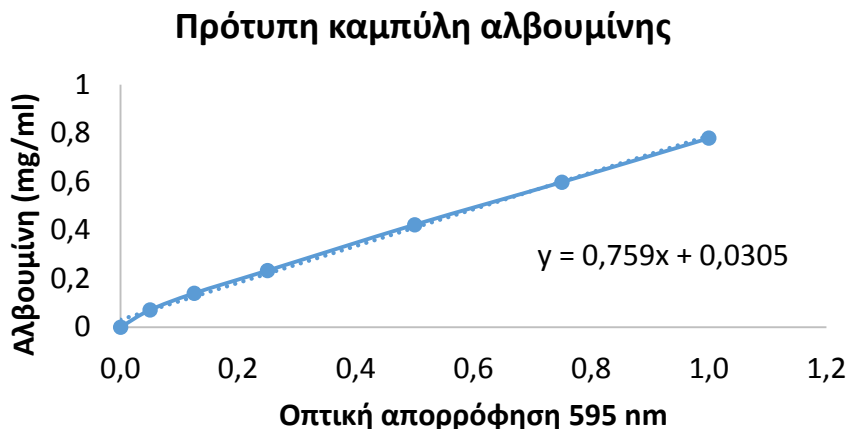
Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) επιτρέπει την αυτοματοποιημένη ανάλυση εναιωρήματος κυττάρων ή συστατικών τους ενόσω αυτά διέρχονται μέσω νηματικής ροής από σημείο που προσπίπτει δέσμη φωτός. Αναλύει πολλαπλά χαρακτηριστικά σε μεμονωμένα κύτταρα με μεγάλη ταχύτητα (υπερβαίνει τα 1000/sec). Τα κύτταρα εστιάζονται μέσω υδροδυναμικής ροής και προσπίπτει πάνω τους δέσμη λέιζερ, η σκέδαση της οποίας γίνεται αντιληπτή από ανιχνευτές φθορισμού. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι σωματίδια μήκους μεταξύ 0,2 και 150 μm μπορούν να σκεδάσουν το φως, ενώ παράλληλα τυχόν χρωστικές (όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό GSH και ROS) διεγείρονται και εκπέμπουν φως σε διαφορετικό μήκος κύματος από αυτό της πηγής. Τα δεδομένα που παραλαμβάνονται από τους ανιχνευτές αναλύονται από ειδικό λογισμικό και προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος και την κοκκίωση (πολυπλοκότητα) κάθε κυττάρου καθώς και για τα επίπεδα φθορισμού ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη χρωστική. Η εμπρόσθια σκέδαση (Forward Scattering, FSC) αφορά τον όγκο του κυττάρου ενώ η πλάγια (Side Scattering, SSC) σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου (όπως ο αριθμός των ενδοκυτταρικών οργανιδίων ή το μέγεθος του πυρήνα).

Για την μέτρηση των επιπέδων GSH και ROS έγινε χρήση των χρωστικών mercury orange (MO) και DCF-DA αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, η MO συνδέεται απευθείας στην GSH ενώ η

DCF-DA αρχικά αποακετυλιώνεται από ενδογενείς εστεράσες και εν συνεχεία οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Για το σκοπό αυτό, το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύθηκε σε PBS και προστέθηκε η εκάστοτε χρωστική (είτε 10μM mercury orange είτε 10μM DCF-DA) ακολουθούμενη από επώαση στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Έπειτα από πλύση, φυγοκέντρηση (300 g, 5 min, 4°C) και επαναδιάλυση του ιζήματος σε PBS πραγματοποιήθηκε η μέτρηση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 580 nm για την GSH και 488 και 530 nm για τις ROS. Μετρήθηκαν ακόμα και τα FSC, SSC για τον προσδιορισμό μεγέθους και πολυπλοκότητας, αντίστοιχα. Συνολικά μετρήθηκαν 10⁴ κύτταρα σε κάθε δείγμα, ενώ η ένταση φθορισμού της κάθε χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση του λογισμικού BD Cell Quest. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

3.1.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για την μέτρηση των δεικτών TBARS και CARB απαιτήθηκε ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης που περιέχεται στα κυτταρικά εναιωρήματα. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Αναλυτικότερα, η περιεχόμενη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 συνδέεται με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών παράγοντας ένα χρωμογόνο μπλε προϊόν που απορροφά στα 595 nm. Είκοσι μl δείγματος αναμίχθηκαν με 980 μl αντιδραστηρίου Bradford, αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 30 min στο σκοτάδι. Ακολούθως μετρήθηκε η οπτική τους απορρόφηση στα 595 nm έναντι τυφλού που αντί για δείγμα περιείχε PBS (στο οποίο επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα). Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης από 0,05 έως και 1,5 mg/ml δίνοντας την εξίσωση $y=0,759x +0,0305$ (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης

3.1.6 Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS

Η λιπιδική υπεροξειδωση των κυττάρων εκτιμήθηκε με βάση το βιοδείκτη TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) που βασίζεται στο πρωτόκολλο των Keles και συνεργατών (167). Η οξειδωση λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία παραπροϊόντων ένα εκ των οποίων είναι η μηλονική διαλδεϋδη (Malondialdehyde, MDA). Η MDA αλληλεπιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε αναλογία 1:2 δίνοντας ένα χρωμογόνο προϊόν που απορροφά στα 530 nm.

Αναλυτικότερα, έπειτα από την μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών, ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχούσε σε 100 µg πρωτεΐνης αναμίχθηκε με PBS μέχρι τελικού όγκου τα 400 µl και εν συνεχεία με 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) καθώς και 500 µl τριχλωροξικού οξέος (TCA) 35%. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 min σε RT και μετά προστέθηκε 1 ml διαλύματος θειικού νατρίου και θειοβαρβιτουρικού οξέος (2M Na₂SO₄, 55 mM TBA). Έπειτα από ανάδευση, τα δείγματα επώαστηκαν για 45 min σε υδατόλουτρο στους 95°C. Έπειτα από 5 min σε πάγο ακολούθησε η προσθήκη 1 ml διαλύματος TCA 70%, ανάδευση και φυγοκέντρηση (15000 g, 3 min, 4°C). Η οπτική απορρόφηση του υπερκειμένου μετρήθηκε στα 530 nm. Σε κάθε πείραμα ο μάρτυρας περιείχε τα πάντα εκτός του κυτταρικού αιωρήματος ενώ κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε ως nmol TBARS ανά mg πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης της MDA. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$TBARS \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{A_{\delta} - A_0}{1,56 \times 10^5} \right) \times \left(\frac{3400}{V_{\delta}} \right) \left(\frac{mg}{mL} \right)$$

A_{δ} : Η οπτικής απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

$1,56 \times 10^5$: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

3400: Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε μ l

V_{δ} : Ο όγκος (σε μ l) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 μ g πρωτεΐνης

3.1.7 Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Η ποσότητα των καρβονυλίων προσδιορίστηκε με βάση το πρωτόκολλο των Patsoukis και συνεργατών (168). Συγκεκριμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών μπορούν να οξειδωθούν δημιουργώντας έτσι τα αντίστοιχα καρβονύλια. Αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη χρωστική DNPH (δινιτρο φαινυλδραζίνη) δημιουργώντας ένα χρωμογόνο προϊόν που απορροφά στα 370 nm.

Αναλυτικότερα, με βάση τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε ποσότητα κυτταρικού αιωρήματος που να αντιστοιχεί σε 100 μ g πρωτεΐνης και αναμίχθηκε με PBS έως τελικού όγκου 400 μ l (το κάθε δείγμα είχε το τυφλό του). Προστέθηκαν ακόμα 500 μ l DNPH (10 mM διαλυμένου σε HCL 2,5M) για τα δείγματα και 500 μ l HCL (2.5M) για τα τυφλά. Τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι, ενώ ανά 15 min υφίσταντο ανάδευση. Ακολούθως, προστέθηκαν 100 μ l TCA 100% και φυγοκεντρήθηκαν (15000 g, 5 min, 4°C). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και πραγματοποιήθηκαν 3 βήματα πλύσης με 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v) και φυγοκέντρηση (15000 g, 5 min, 4°C) με απομάκρυνση του υπερκειμένου. Μετά την τρίτη πλύση, στο ίζημα προστέθηκε 1 ml ουρίας (5M, pH 2,3) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 15 min. Τέλος, φυγοκεντρήθηκαν (15000 g, 3 min, 4°C) και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 370 nm.

Η συγκέντρωση των καρβονυλίων υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\delta} - A_0}{0,022}}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{mg}{mL} \right)} \right) \times \left(\frac{1000}{V_{\delta}} \right)$$

A_{δ} : Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

0,022: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

1000: Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε μl

V_{δ} : Ο όγκος (σε μl) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 μg πρωτεΐνης

3.1.8 Εκτίμηση γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών

Το εκχύλισμα με την ισχυρότερη επίδραση στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης στους μυοβλάστες επιλέχθηκε ώστε να εξεταστεί η επίδρασή του στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των συγκεκριμένων κυττάρων με τη χρήση μικροσυστοιχιών. Για το λόγο αυτό, αφού χορηγήθηκε ο καφές και επώαστηκαν τα κύτταρα για 24 ώρες, απομονώθηκε ολικό mRNA με τη βοήθεια εμπορικά διαθέσιμου kit. Το mRNA στάλθηκε για ανάλυση στο Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης με τη χρήση της τεχνολογίας MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip (περιέχει πληθώρα αλληλουχιών DNA που καλύπτουν όλα τα γονίδια του ποντικού). Αρχικά, το RNA αραιώθηκε στα 50 ng/μl. Ακολούθησε η μετατροπή του σε συμπληρωματικό RNA (cRNA), οι αζωτούχες βάσεις του οποίου ήταν επισημασμένες με βιοτίνη κάνοντας χρήση του kit της Illumina® TotalPrep™-96 για ενίσχυση RNA. Εν συνεχεία, το cRNA υβριδοποιήθηκε έναντι των μικροσυστοιχιών MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip που καλύπτουν 45200 μεταγραφήματα. Τέλος, η ποσοτική ανάλυση φθορισμού των μικροσυστοιχιών έγινε με τη χρήση του λογισμικού BeadStudio.

3.1.9 Εκτίμηση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real-time PCR

3.1.9.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA

Αρχικά απομονώθηκε το ολικό RNA από τα κύτταρα με τη χρήση ειδικού εμπορικά διαθέσιμου kit (QIAGEN). Η απομόνωση προϋποθέτει τη λύση των κυττάρων μέσω ειδικού διαλύματος παρουσία μερκαπτοαιθανόλης. Ακολούθως τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται

μέσω αιθανόλης και κατακρατώνται σε ειδική θετικά φορτισμένη μεμβράνη. Τα νουκλεϊκά οξέα εκλύονται και κατόπιν το DNA αποικοδομείται με τη χρήση DNAσης.

Η ποσότητα του RNA αποτιμάται στα 260 nm (όπου τιμή απορρόφησης 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40 µg/ml) ενώ η καθαρότητα του δείγματος από πρωτεΐνες εξετάζεται μέσω της απορρόφησης στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος 260/280 (επιθυμητές οι τιμές >1,8). Η μετατροπή του mRNA σε cDNA είναι το επόμενο βήμα και πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών oligo-dTs που υβριδίζονται με την πολαδενυλική ουρά των mRNA και αναγνωρίζονται από την αντίστροφη μεταγραφή, η οποία με τη σειρά μετατρέπει το mRNA σε cDNA.

3.1.9.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων

Τα παραγόμενα cDNAs κάθε δείγματος μελετήθηκαν με real-time PCR με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα, και δη της καταλάσης (*cat*), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (*sod1*) και της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (*gclc*).

Αυτό επιτυγχάνεται ενισχύοντας τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσία της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδέεται πάνω σε δίκλινα τμήματα DNA, εκπέμποντας φθορισμό στα 516 nm (απορροφά στα 492 nm). Έτσι σε κάθε κύκλο της PCR μετράται ο φθορισμός. Στους πρώτους κύκλους της PCR, ο φθορισμός που εκπέμπεται δεν επαρκεί για να ξεπεραστεί η ουδός (Ct – Cycle Threshold). Η τιμή Ct αντιστοιχεί στην αρχική ποσότητα DNA του δείγματος και συγκεκριμένα όσο πιο χαμηλή είναι, τόσο περισσότερα αντίγραφα DNA (και άρα του εξεταζόμενου mRNA) υπήρχαν αρχικά (169).

Η σύγκριση των επιπέδων των mRNA μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας καφέ προϋποθέτει την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κάθε δείγματος ως προς ένα γονίδιο αναφοράς. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία το γονίδιο αυτό ήταν της αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Τα γονίδια αναφοράς έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους χωρίς να επηρεάζονται ιδιαίτερα από εξωγενείς παράγοντες (170).

Η ενίσχυση των τμημάτων cDNA όλων των γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (*cat*, *sod1*, *txn*, *hmox1*, *nrf2*, *nqo1*, *gclc*, *gsr*, *gpx1* και *gsta2*) καθώς και του γονιδίου κανονικοποίησης (*gapdh*) πραγματοποιήθηκε σε αντιδράσεις των 10 µl που περιείχαν SYBR® Select Master Mix (2X, applied biosystems, USA), 0,25 µM από τον κάθε εκκινητή, 50 nM ROX

Low και 25 ng cDNA. Οι εκκινητές βασίστηκαν στη βιβλιογραφία και οι αλληλουχίες τους φαίνονται στους πίνακες 4 και 5. Οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή (μχ3005P system, Stratagene, UK) ήταν οι ακόλουθες: 3 min στους 95 °C; 45 κύκλοι (15 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55°C για όλα τα γονίδια στους μωβλάστες και την πλειοψηφία των γονιδίων στα ενδοθηλιακά με εξαίρεση τα *cat* και *gsta2* για τα οποία χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 53°C, ακολουθούμενα από 30 sec στους 72 °C). Τέλος, πραγματοποιήθηκε και καμπύλη αποδιάταξης από τους 53°C έως και τους 95°C για να ελεγχθεί η ειδικότητα της σύνδεσης των εκκινητών.

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών για τους μωβλάστες

Γονίδιο	Gene ID	Εκκινητής (5'-3')
<i>cat</i>	12359	Forward: TGAGAAGCCTAAGAACGCAATTC Reverse: CCCTTCGCAGCCATGTG
<i>sod1</i>	20655	Forward: GTGATTGGGATTGCGCAGTA Reverse: TGGTTTGAGGGTAGCAGATGAGT
<i>txn</i>	22166	Forward: CCGCGGGAGACAAGCTT Reverse: GGAATGGAAGAAGGGCTTGATC
<i>hmox1</i>	15368	Forward: CACGCATATACCCGCTACCT Reverse: CCAGAGTGTTTCATTCGAGCA
<i>nrf2</i>	18024	Forward: CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA Reverse: GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
<i>nqo1</i>	18104	Forward: TATCCTTCCGAGTCATCTCTAGCA Reverse: TCTGCAGCTTCCAGCTTCTTG
<i>gclc</i>	14629	Forward: ATCTGCCAAGGCGGCAAC Reverse: ACTCCTCTGCAGCTGGCTC
<i>gsr</i>	14782	Forward: GCTATGCAACATTCGCAGATG Reverse: AGCGGTAAACTTTTTCCCATG
<i>gpx1</i>	14775	Forward: GAAGAACTTGGGCCATTTGG Reverse: TCTCGCCTGGCTCCTGTTT
<i>gsta2</i>	14858	Forward: CGTCCACCTGCTGGAACCTC Reverse: GCCTTCAGCAGAGGGAAAGG
<i>gapdh</i>	14433	Forward: AACGACCCCTTCATTGAC Reverse: TCCACGACATACTCAGCAC

Πίνακας 8: Αλληλουχίες εκκινητών για τα ενδοθηλιακά κύτταρα

Γονίδιο	Gene ID	Εκκινητής (5'-3')
<i>cat</i>	847	Forward: CCAGAAGAAAGCGGTCAAGAA Reverse: TGGATGTGGCTCCCGTAGTC
<i>sod1</i>	6647	Forward: AGGGCATCA TCAATTTTCGAG Reverse: GGGCCTCAGACTACATCCAA
<i>txn</i>	7295	Forward: TTTCCATCGGTCCCTTACAGC Reverse: TTGGCTCCAGAAAATTCACC
<i>hmox1</i>	3162	Forward: GGCCTGGCCTTCTTCACCTT Reverse: GAGGGGCTCTGGTCCTTGGT
<i>nrf2</i>	4780	Forward: ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA Reverse: ACTGCTCTTTGGACATCATTTCG
<i>nqo1</i>	1728	Forward: GGGCAAGTCCATCCCAACTG Reverse: GCAAGTCAGGGAAGCCTGGA
<i>gclc</i>	2729	Forward: GAAGAAGATATTTTTCTGTCATTGAT Reverse: CCATTCATGTATTGAAGAGTGAATTT
<i>gsr</i>	2936	Forward: CCAGCTTAGGAATAACCAGCGATGG Reverse: GTCTTTTTAACCTCCTTGACCTGGGAGAAC
<i>gpx1</i>	2876	Forward: CGCTTCCAGACCATTGACATC Reverse: CGAGGTGGTATTTTCTGTAAGATCA
<i>gapdh</i>	2597	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAG Reverse: GATGCAGGGATGATGTTC

3.1.10 Εξουδετέρωση της ρίζας O₂^{•-}

Για τον προσδιορισμό της εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{•-} χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Gülçin και συνεργατών (171), στο οποίο το σύστημα PMS-NADH παράγει ρίζα σουπεροξειδίου, το οποίο με τη σειρά του ανάγει το NBT σε φορμαζάνη με μέγιστη απορρόφηση στα 560 nm. Ένα εκχύλισμα που περιέχει αντιοξειδωτικά μπορεί να αναστείλει τη μετατροπή αυτή, μειώνοντας έτσι την παρατηρούμενη απορρόφηση.

Αναλυτικότερα, 800 µl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (16 mM, pH 8,0) αναμίχθηκαν με 125 µl NBT (300 µM), 125 µl NADH (468 µM) και 125 µl PMS (60 µM) και 50 µl εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα αναδεύτηκαν, επώαστηκαν για 30 min στο σκοτάδι και μετρήθηκε η οπτική τους απορρόφηση στα 560 nm. Ο μάρτυρας δεν περιείχε εκχύλισμα, ενώ το

τυφλό κάθε συγκέντρωσης δεν περιείχε PMS. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν ενώ πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκφράστηκε ως ειδική ενεργότητα, η οποία προέκυψε από το συνδυασμό της τιμής IC₅₀ και του πολυφαινολικού περιεχομένου. Η τιμή IC₅₀ προέκυψε από την καμπύλη εξουδετέρωσης/συγκέντρωσης. Το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας για κάθε δεδομένη συγκέντρωση προέκυψε από τον παρακάτω τύπο

$$\% \text{ Εξουδετέρωσης ρίζας} = \frac{(A_0 - A_\delta)}{A_0} \times 100\%$$

A₀: Οπτική απορρόφηση του μάρτυρα.

A_δ: Οπτική απορρόφηση του δείγματος.

3.1.11 Εξουδετέρωση της ρίζας HO·

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία των Halliwell και συνεργατών (172) κατά την οποία παράγεται ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton, η οποία με τη σειρά της οξειδώνει τη δεοξυριβόζη δημιουργώντας μαλονδιαλδεΐδη. Η τελευταία αλληλεπιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ δίνοντας χρωμογόνο προϊόν που απορροφά στα 520 nm. Ένα αντιοξειδωτικό εκχύλισμα παρεμποδίζει την οξείδωση της δεοξυριβόζης μειώνοντας έτσι την παρατηρούμενη απορρόφηση.

Αναλυτικότερα, 75 μl του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις προστέθηκαν σε 225 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,2 M, pH 7,4), 75 μl 2-δεοξυριβόζης (10 mM), 75 μl FeSO₄- EDTA (10 mM), 262,5 μl H₂O και 75 μl H₂O₂ (10 mM), ενώ ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Εν συνεχεία προστέθηκαν 375 μl TCA (2,8%) και 375 μl TBA (1%) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 10 min. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 10 min, φυγοκέντρηση (3000 g, 10 min, 25°C) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm. Ο μάρτυρας δεν περιείχε εκχύλισμα καφέ ενώ τα τυφλά για κάθε συγκέντρωση δεν περιείχαν υπεροξείδιο του υδρογόνου. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και στη δοκιμασία αναστολής του σουπεροξειδίου (3.1.9).

3.1.12 Επίδραση στη δραστικότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα

3.1.12.1 Αναστολή δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης (XO)

Η XO καταλύει τη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ σε δύο βήματα κατά τα οποία παράγει ως παραπροϊόντα ρίζα σουπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου (52). Η δραστικότητά της (και άρα η πιθανή αναστολή από ένα εκχύλισμα) μπορεί να προσδιοριστεί με βάση το πρωτόκολλο των Veskoukis και συνεργατών (173). Η αντίδραση παρακολουθείται στα 295 nm καθώς εκεί απορροφά το ουρικό οξύ, έτσι ένα εκχύλισμα που καταστέλλει τη δραστικότητα του ενζύμου θα προκαλεί μείωση της απορρόφησης.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 ml και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (33 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5), ξανθίνη (50 μM) και εκχύλισμα καφέ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η εκκίνηση της αντίδρασης σηματοδοτήθηκε από την προσθήκη οξειδάσης της ξανθίνης (0,015 U/ml αραιωμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα), ενώ αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου ξεκίνησε η καταμέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 295nm για 4 min. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

Δημιουργήθηκε καμπύλη αναστολής/συγκέντρωσης και υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀. Εν συνεχεία και με βάση το πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάθε εκχυλίσματος υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητά τους (όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τόσο μεγαλύτερη είναι η αναστολή του ενζύμου).

3.1.12.2 Συλλογή και προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

Συλλέχθηκε αίμα από υγιή εθελοντή σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυγοκεντρήθηκε (1370 g, 10 min, 4°C). Το πλάσμα απομακρύνθηκε και τα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με τη βοήθεια dH₂O (1:1 v/v) και βίαιη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (4000 g, 15 min, 4°C) και το υπερκείμενο – που αποτελεί το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (red blood cell lysate, RBCL)- συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για περαιτέρω χρήση.

3.1.12.3 Αναστολή δραστικότητας της καταλάσης

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Aebi (174) στο οποίο η καταλάση διασπά το H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο. Η ικανότητα ενός εκχυλίσματος να αναστέλλει ή να επάγει τη δραστικότητα του ενζύμου θα μεταφραστεί σε αλλαγή της παρατηρούμενης απορρόφησης.

Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 3 ml, και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4), RBCL (1:10 v/v) και εκχύλισμα καφέ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 10 min στους 37°C, ενώ η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη H₂O₂ (30%). Τέλος τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα για 2 min στα 240 nm καθώς εκεί απορροφά το υπεροξείδιο του υδρογόνου, συνεπώς πτώση της απορρόφησης μεταφράζονταν σε δραστικότητα της καταλάσης. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις τριπλούν. Δημιουργήθηκε καμπύλη αναστολής/συγκέντρωσης και υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀. Εν συνεχεία και με βάση το πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάθε εκχυλίσματος υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα τους (όσο μεγαλύτερη τιμή, τόσο καλύτερη η αναστολή του ενζύμου).

3.1.13 Τεστ του Ames

Η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό πιθανών μεταλλαξιγόνων ή αντιμεταλλαξιγόνων ενώσεων ή/και εκχυλισμάτων (175). Η δοκιμασία αυτή κάνει χρήση του βακτηριακού είδους *Salmonella typhimurium* (το στέλεχος TA102 στην παρούσα εργασία, που είναι ευαίσθητο σε οξειδωτικές βλάβες) που φέρει κάποιες μεταλλάξεις οι οποίες το καθιστούν ιδανικό. Η κυριότερη αφορά την απενεργοποίηση ενός ενζύμου του οπερονίου της ιστιδίνης που καθιστά το βακτήριο αυξότροφο ως προς το αμινοξύ αυτό. Άλλες σημαντικές μεταλλάξεις ευαισθητοποιούν το στέλεχος στη δράση μεταλλαξιγόνων παραγόντων κάνοντας πιο εύκολη την ανίχνευση μεταλλάξεων. Παραδείγματος χάριν, η μετάλλαξη του γονιδίου *rfa* οδηγεί στη δημιουργία ελλειμματικής λιποπολυσακχαριτικής στοιβάδας, καθιστώντας την έτσι πιο διαπερατή σε χημικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, το στέλεχος περιέχει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο ενεργοποιεί τον επιρρεπή σε λάθη μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών DNA (error-prone recombinational repair pathway), αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες μεταλλαξιγένεσης, ενώ ένα ακόμα πλασμίδιο που περιέχεται σε πολλά αντίγραφα είναι το pAQ1 που φέρει μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστιδίνης και το οποίο του αυξάνει κατά πολύ τις πιθανότητες εμφάνισης επαναμεταλλαγμένων αποικιών.

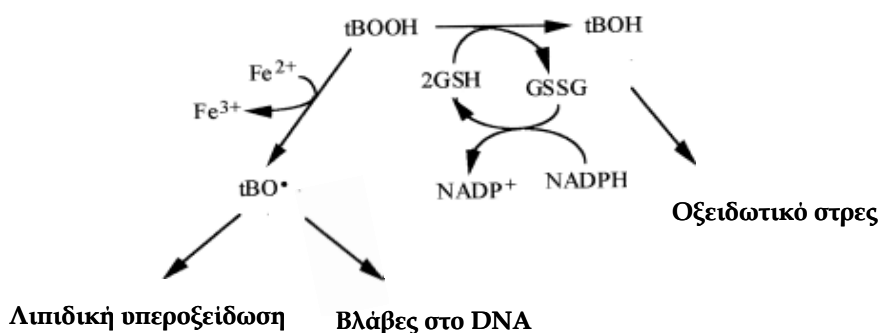
Η ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους σε θρεπτικό μέσο παρουσίας ιχνών ιστιδίνης επιτρέπει περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων (6-8) κατά τις οποίες είναι πιθανό να προκύψουν επαναμεταλλάξεις στο οπερόνιο της ιστιδίνης, επαναφέροντας τον άγριο τύπο. Τα επαναμεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν πλέον να αναπτυχθούν κανονικά, σχηματίζοντας αποικίες, ο αριθμός των οποίων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος βακτηρίου (περίπου 200-300 ανά τριβλίο για το TA102). Η ταυτόχρονη παρουσία ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα ωστόσο, προκαλεί

δοσοεξαρτώμενη αύξηση στον αριθμό των επαναμεταλλάξεων και άρα των παρατηρούμενων αποικιών, ενώ αντίθετα ένας αντιμεταλλαξιγόνος παράγοντας μειώνει τις αποικίες.

Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση γνωστού μεταλλαξιγόνου παράγοντα (*t*-BOOH) σε συγκέντρωση όπου διπλασιάζει τις παρατηρούμενες αποικίες ενώ ταυτόχρονα χορηγήθηκαν εκχυλίσματα καφέ σε διάφορες συγκεντρώσεις για να φανεί η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση τους.

3.1.13.1 Μηχανισμός δράσης του *t*-BOOH

Το οργανικό υδροϋπεροξειδίο *t*-BOOH είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας ο μηχανισμός δράσης του οποίου παρουσιάζεται στην εικόνα 25. Συγκεκριμένα, εξαντλεί τα ενδογενή επίπεδα GSH μέσω της δράσης της GPx ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} σχηματίζοντας ρίζες *t*-BO \cdot . Και οι δυο αυτοί μηχανισμοί συνδέονται με την οξείδωση κυτταρικών μακρομορίων (176).



Εικόνα 25: Μηχανισμός δράσης του *t*-BOOH

3.1.13.2 Δοκιμασία εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων καφέ

Αρχικά, το θρεπτικό υλικό (Nutrient Broth) μολύνθηκε με το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 και επώαστηκε στους 37°C έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 540 nm φτάσει το 0,1-0,2 (αντιστοιχεί σε $1-2 \times 10^9$ αποικίες ανά ml), που υποδηλώνει ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση αύξησης.

Ακολούθως, 100 μl της καλλιέργειας προστέθηκαν σε 2 ml διαλύματος Top Agar (περιέχει NaCl, Agar και ίχνη ιστιδίνης) μαζί με 50 μl *t*-BOOH (0,4 mM τελική συγκέντρωση) και 50 μl εκχυλίσματος καφέ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 45°C αφενός για να μην πήξει το άγαρ και αφετέρου για να μην υποστούν ανεπανόρθωτη βλάβη τα βακτήρια από τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, το διάλυμα επιστρώθηκε σε τριβλίο που είχε θρεπτικό υπόστρωμα Glucose Minimal άγαρ [περιέχει γλυκόζη και άλατα Vogel-Bonner ($MgSO_4$, κιτρικό οξύ, K_2HPO_4 και $Na_2NH_2PO_4$)].

Μετά την επίστρωση και τη στερεοποίηση του διαλύματος, τα τριβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα σε κλίβανο στους 37°C για 48 ώρες και τέλος καταμετρήθηκαν οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες ανά τριβλίο. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε όσο το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες. Κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιείχε οξειδωτικό παράγοντα ούτε εκχύλισμα καφέ, ενώ ο θετικός μάρτυρας δεν περιείχε εκχύλισμα καφέ. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε και η επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ στα βακτήρια απουσία του οξειδωτικού παράγοντα στις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κάθε εκχυλίσματος

Η συγκέντρωση του *t*-BOOH επιλέχθηκε μετά από εξέταση διαφόρων συγκεντρώσεων του (0,2, 0,4, 0,8 και 1,6 mM/τριβλίο) ως προς την μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτήρια. Η συγκέντρωση 0,4 mM/τριβλίο διπλασίασε τις παρατηρούμενες επαναμεταλλάξεις σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, χωρίς όμως να παρουσιάσει τοξικότητα συγκριτικά με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

3.1.13.3 Μεταβολική ενεργοποίηση με το μίγμα μεταβολικών ενζύμων S9

Τα βακτήρια (όπως η *S. Typhimurium*) δε διαθέτουν τα μεταβολικά συστήματα των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων και γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε το μίγμα S9 (προερχόμενο από ομογενοποίηση ήπατος επιμύων της φυλής Sprague Dawley) που έχουν εκτεθεί σε Aroclor 1254 (500 mg/Kg, ενδοπεριτοναϊκά) προκειμένου να μεταβολιστούν τα εκχυλίσματα καφέ προτού χορηγηθούν στα βακτήρια. Κατ' αυτό τον τρόπο εξετάστηκε η πιθανή επίδραση του μεταβολισμού των ενώσεων που περιέχονται στα εκχυλίσματα καφέ στην αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους. Η μεταβολική ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένα εκχυλίσματα (Brazil πράσινο, R4 και R7) ώστε να φανεί η επίδραση τόσο σε εκχύλισμα πράσινων κόκκων όσο και σε (ελαφρά ή αρκετά) καβουρδισμένων. Η πειραματική διαδικασία ήταν ακριβώς ίδια με την προηγούμενη ενότητα ([3.1.12.2](#)) με μόνη διαφορά την ανάμιξη των εκχυλισμάτων καφέ με το μίγμα S9 πριν τη χορήγηση στα βακτήρια. Καθώς τα ένζυμα που περιέχονται στο διάλυμα S9 απαιτούν διάφορους συμπαραγόντες, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αποτελούμενο από KCl (256 mM), MgCl₂ (6mM), 6-φωσφορική-γλυκόζη (4mM), NADPH (3mM) και NaH₂PO₄ (77mM) (175).

3.1.13.4 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας

Η τοξικότητα τόσο του *t*-BOOH όσο και των εκχυλισμάτων καφέ ελέγχθηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου (40x μεγέθυνση). Εκτός των παρατηρούμενων με το μάτι επαναμεταλλαγμένων

αποικιών, κάθε τριβλίο φέρει και μεγάλο αριθμό μικροσκοπικών αποικιών (background lawn) που δεν είναι ορατές διά γυμνού οφθαλμού. Η ύπαρξή τους οφείλεται στην παρουσία ιχνών ιστιδίνης στο Top Agar που επιτρέπει μικρό αριθμό διαιρέσεων ακόμα και στα μη επαναμεταλλαγμένα βακτήρια. Κατ' αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ της πυκνότητας των μικροαποικιών στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και αν η πυκνότητα παραμένει παρεμφερής τότε το εξεταζόμενο εκχύλισμα θεωρείται πως δεν προκαλεί τοξικότητα. Αν είναι ήπια τοξικό τότε μειώνονται οι μικροαποικίες ενώ αν παρουσιάζει έντονη τοξικότητα τότε οι αποικίες απουσιάζουν πλήρως.

3.1.13.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ για κάθε εκχύλισμα με βάση το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του *t*-BOOH από τα εκχυλίσματα του καφέ υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τριβλίο σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left(\frac{A_{\theta} - A_{\delta}}{A_{\theta} - A_0} \right) \times 100\%$$

A_θ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τριβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και *t*-BOOH).

A_δ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τριβλίο παρουσία του εκχυλίσματος καφέ (TA102, εκχύλισμα και *t*-BOOH).

A₀: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τριβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

3.1.14 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εκχυλισμάτων καφέ μέσω χρωματογραφίας

3.1.14.1 Ανάλυση με UHPLC-HRMS

Τα εκχυλίσματα καφέ εξατμίστηκαν με υγρό άζωτο και από το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκαν 4 mg από το κάθε εκχύλισμα και αραιώθηκαν για να φτάσουν την συγκέντρωση των 400 μg/ml. Στη συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με τις παρακάτω πειραματικές συνθήκες:

- Συγκέντρωση(mg/mL): 0.4
- Διαλύτης έγχυσης: Μεθανόλη/Νερό-φορμικό οξύ(0.1%) 60:40 v/v
- Όργανο: UHPLC-Hybrid LTQ-Orbitrap Discovery HRMS, ESI(-) equipped with electrospray ionisation (ESI) MAX2 source
- Στήλη: Fortis, C18 (Διαστάσεις στήλης: 100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)
- Θερμοκρασία στήλης (°C): 40
- Πίεση(psi): 9000-9500
- Ροή (μ L/min): 400
- Όγκος έγχυσης (μ L): 10
- Θερμοκρασία δείγματος (°C): 10

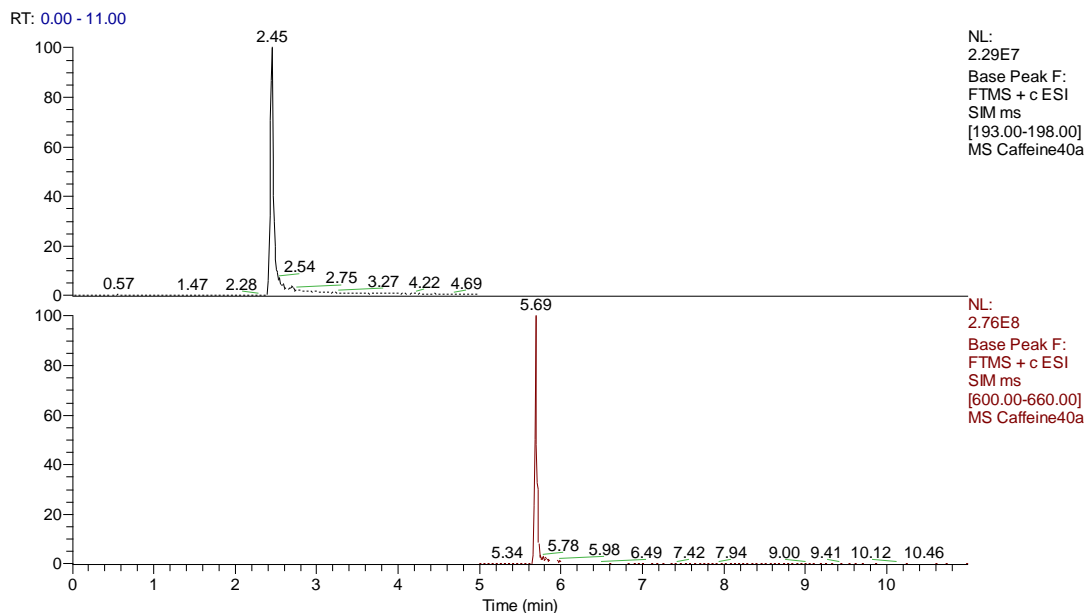
Πίνακας 9: Πρωτόκολλο UHPLC

Κινητή φάση:	Έκλυση:	Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	%A	%B
A = H ₂ O, 0,1 % φορμικό οξύ B = Ακετονιτρίλιο	1	0,01	400	95	5
	2	3,00	400	95	5
	3	35,0	400	0	100
	4	38,0	400	0	100
	5	40,0	400	95	5
	6	45,0	400	95	5

3.1.14.2 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της καφεΐνης

Για την ανίχνευση της καφεΐνης μέσα στα εκχυλίσματα, τα δείγματα εγχύθηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση στο φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε ESI⁺. Η καφεΐνη ήταν η μοναδική ουσία που ανιχνεύθηκε στα εκχυλίσματα σε συνθήκες θετικού ιονισμού.

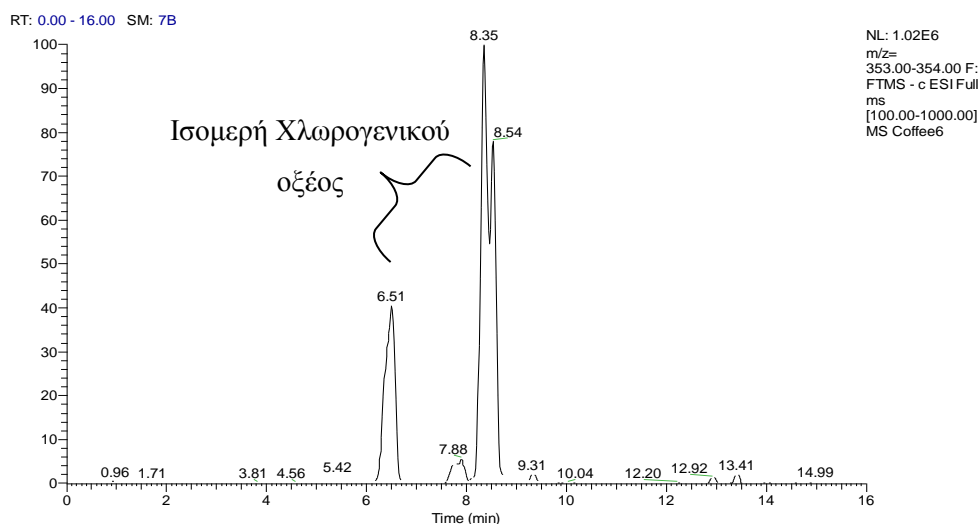
Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν διαλύματα καφεΐνης 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 και 0,2 μ g/ml ενώ το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρεζερπίνη σε συγκέντρωση 1,6 μ g/ml. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στην υβριδική τροχιακή παγίδα ιόντων με την δοκιμασία απομόνωσης του επιθυμητού ιόντος SIM. Τα μοριακά ιόντα της καφεΐνης και της ρεζερπίνης αντιστοιχούν σε m/z 195,087 και 609,279 αντίστοιχα όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 26. Το μοντέλο βαθμονόμησης ήταν γραμμικό ενώ ο συντελεστής συσχέτισης R^2 ήταν 0,997.



Εικόνα 26: Απεικόνιση των μοριακών ιόντων της καφεΐνης και της ρεζεργπίνης με την δοκιμασία SIM

3.1.14.3 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του χλωρογενικού οξέος

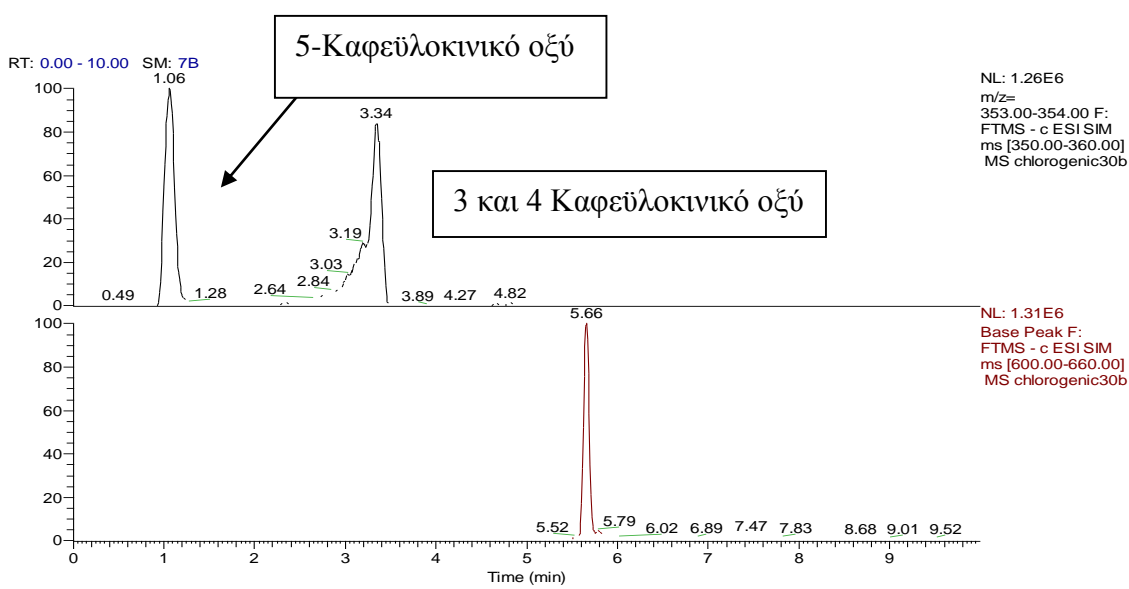
Για την ανίχνευση του χλωρογενικού οξέος μέσα στα εκχυλίσματα, τα δείγματα εγχύθηκαν σε συγκέντρωση 0,4 mg/ml στο φασματόμετρο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε ESI. Το χλωρογενικό οξύ αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν 353,087 ενώ έγινε εμφανής κατά την χρωματογράφηση των δειγμάτων η ύπαρξη τριών ισομερών χλωρογενικού οξέος (εικόνα 27).



Εικόνα 27: Τα τρία ισομερή του χλωρογενικού οξέος

Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν με όξινες συνθήκες τρεις μορφές πρότυπου χλωρογενικού οξέος και διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά οι 2 εκ των τριών μορφών (εικόνα 28) έτσι ώστε να

ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν διαλύματα χλωρογενικού οξέος συγκέντρωσης 40, 30, 20, 15, 5 και 1 µg/ml ενώ το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρεζερπίνη σε συγκέντρωση 1,6 µg/ml. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στην υβριδική τροχιακή παγίδα ιόντων με την δοκιμασία απομόνωσης του επιθυμητού ιόντος SIM. Τα μοριακά ιόντα του χλωρογενικού οξέος και της ρεζερπίνης αντιστοιχούν σε m/z 353,087 και 609,279 αντίστοιχα. Το μοντέλο βαθμονόμησης για τα ισομερή, του 5-Καφεϋλοκινικού οξέος (1,06 min) και του 3 και 4-Καφεϋλοκινικού οξέος που προσδιορίστηκαν ως μία μορφή λόγω δυσχέρειας διαχωρισμού (3,19-3,34 min) ήταν γραμμικά ενώ οι συντελεστής συσχέτισης R^2 ήταν 0,997.



Εικόνα 28: Διαχωρισμός των τριών κύριων ισομορφών χλωρογενικού οξέος (μαύρο χρώμα) και της ρεζερπίνης (κόκκινο χρώμα) με την δοκιμασία SIM

3.1.15 Στατιστική ανάλυση

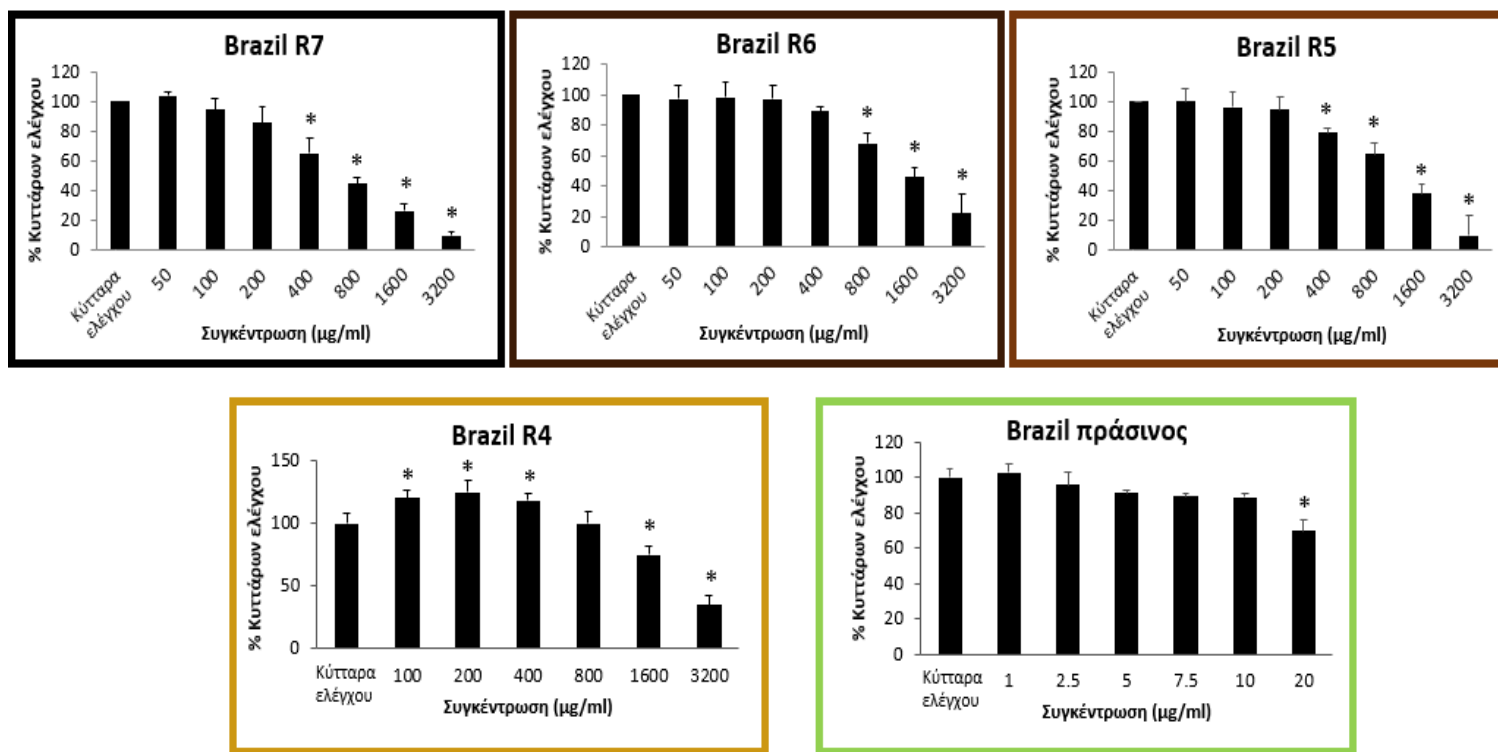
Χρησιμοποιήθηκε το SPSS 20.0 και συγκεκριμένα η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα one-way ANOVA. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0,05$ ενώ τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM.

3.2 Αποτελέσματα

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων ήταν η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητάς τους έναντι των μυοβλαστών (C2C12) και των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926), ώστε να χρησιμοποιηθούν οι μέγιστες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στις περαιτέρω αναλύσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα εκχύλισμα θεωρήθηκε κυτταροτοξικό στη συγκέντρωση που προκαλούσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 20% σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων στα οποία δεν χορηγήθηκε το εκχύλισμα καφέ (control). Η κυτταροτοξικότητα αποτιμήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου XTT και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

3.2.1 Κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου XTT

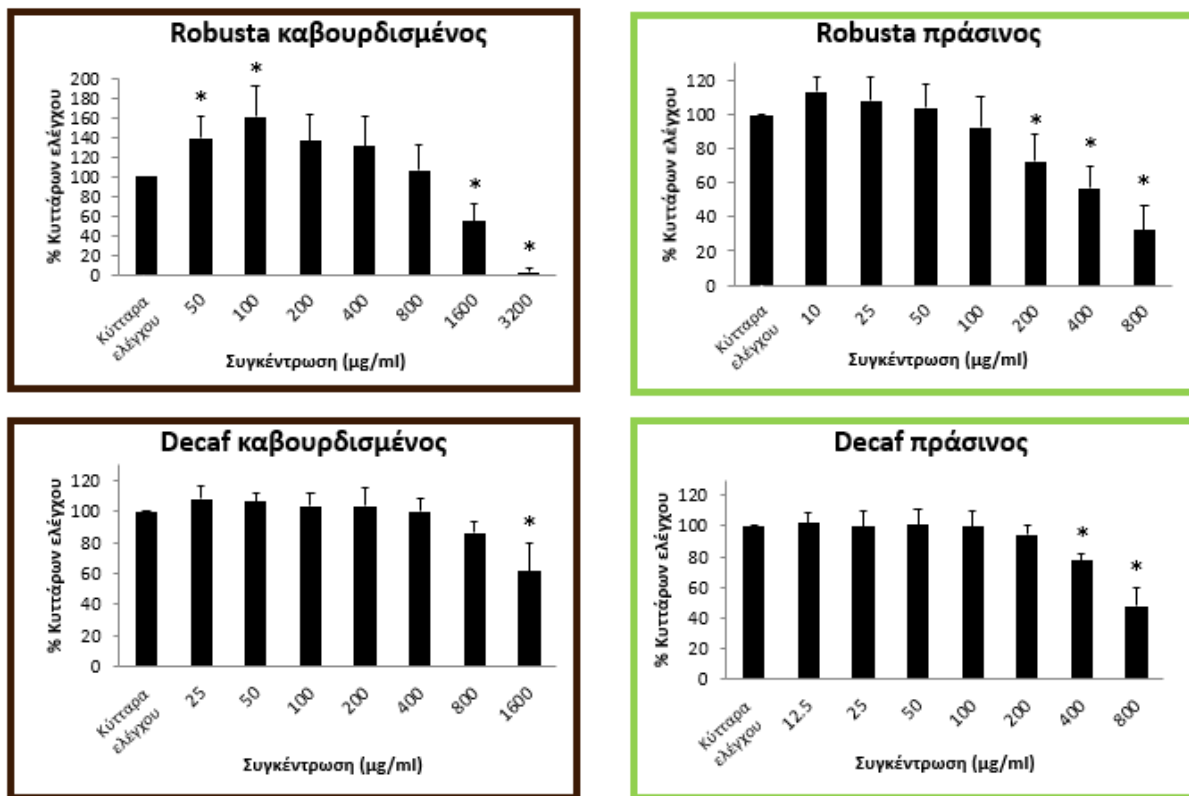
3.2.1.1 C2C12



Διάγραμμα 7: Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Brazil στους μυοβλάστες (C2C12) με βάση τη μέθοδο XTT. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το εκχύλισμα των πράσινων κόκκων ενώ με τα υπόλοιπα τα 4 καβουρδισμένα εκχυλίσματα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$) με τα κύτταρα ελέγχου (που δεν έχουν λάβει εκχύλισμα) ενώ όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στους μυοβλάστες έπειτα από τη χορήγηση των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Brazil, παρατηρήθηκε ότι το πράσινο εκχύλισμα εμφάνισε τοξικότητα στα 20 μg/ml

ενώ τα καβουρδισμένα κατά σειρά (R4/5/6/7) στα 1600, 400, 800 και 400 µg/ml αντίστοιχα. Αξιοσημείωτη ήταν η αύξηση βιωσιμότητας που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του Brazil R4 στις συγκεντρώσεις των 100, 200 και 400 µg/ml κατά 20, 25 και 18%, αντίστοιχα.

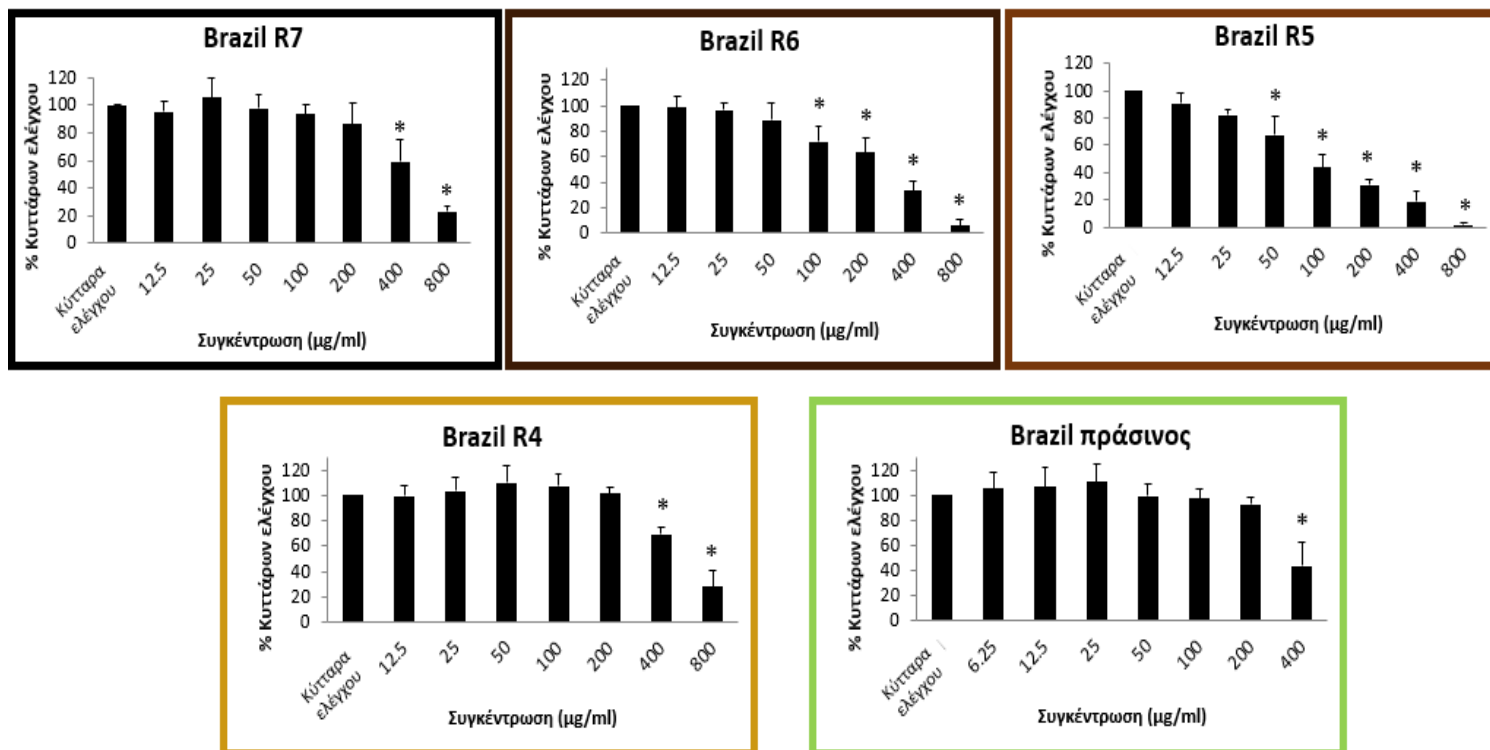


Διάγραμμα 8: Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Robusta και Decaf στους μυοβλάστες (C2C12) με βάση τη μέθοδο ΧΤΤ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το εκχύλισμα των πράσινων κόκκων ενώ με καφέ χρώμα τα καβουρδισμένα εκχυλίσματα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$) με τα κύτταρα ελέγχου (που δεν έχουν λάβει εκχύλισμα) ενώ όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου.

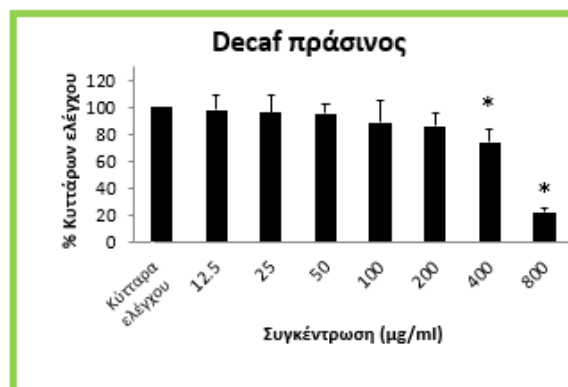
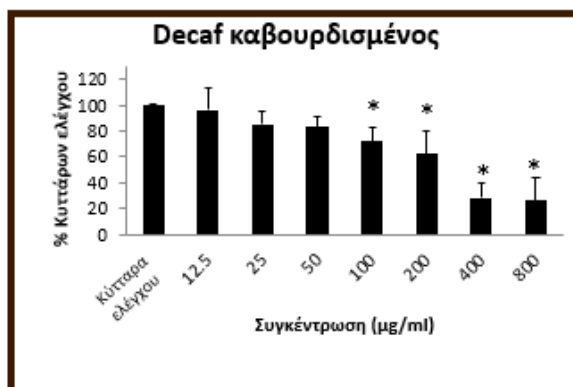
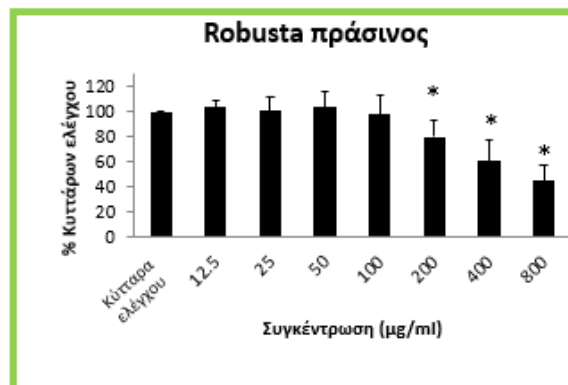
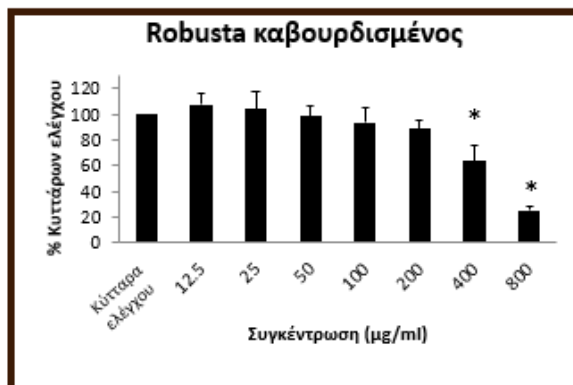
Όσον αφορά τις άλλες δύο ποικιλίες, στη μεν Robusta το εκχύλισμα πράσινου καφέ εμφάνισε τοξικότητα στα 200 µg/ml ενώ αυτό του αντίστοιχου καβουρδισμένου στα 1600 µg/ml. Αξιοσημείωτη και εδώ είναι η αύξηση βιωσιμότητας μόνο από τον καβουρδισμένο καφέ στα 50 και 100 µg/ml κατά 36 και 53% αντίστοιχα. Στο χαρμάνι Decaf, ο πράσινος καφές ήταν τοξικός στα 400 ενώ ο καβουρδισμένος στα 1600 µg/ml. Και στις τρεις ποικιλίες, το εκχύλισμα πράσινου καφέ ήταν πιο τοξικό συγκριτικά με τα αντίστοιχα των καβουρδισμένων κόκκων.

3.2.1.2 EA.hy926

Εν συνεχεία, τα ίδια εκχυλίσματα χορηγήθηκαν και στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στην παραπάνω εικόνα, το πράσινο εκχύλισμα ήταν τοξικό στα 400 µg/ml, ενώ τα καβουρδισμένα κατά σειρά στα 400 (R4), 50 (R5), 100 (R6) και 400 µg/ml (R7). Σε αντίθεση με τους μυοβλάστες δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στη βιωσιμότητα των κυττάρων λόγω χορήγησης του εκχυλίσματος καφέ.



Διάγραμμα 9: Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Brazil στα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) με βάση τη μέθοδο ΧΤΤ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το εκχύλισμα των πράσινων κόκκων ενώ με τα υπόλοιπα τα 4 καβουρδισμένα εκχυλίσματα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$) με τα κύτταρα ελέγχου (που δεν έχουν λάβει εκχύλισμα) ενώ όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου.



Διάγραμμα 10: Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων Robusta και Decaf στα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) με βάση τη μέθοδο ΧΤΤ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το εκχύλισμα των πράσινων κόκκων ενώ με καφέ χρώμα τα καβουρδισμένα εκχυλίσματα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$) με τα κύτταρα ελέγχου (που δεν έχουν λάβει εκχύλισμα) ενώ όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου.

Στις υπόλοιπες δύο ποικιλίες, ο πράσινος Robusta παρουσίασε τοξική δράση στα 200 µg/ml ενώ ο αντίστοιχος καβουρδισμένος στα 400 µg/ml. Στο ντεκαφεϊνέ χαρμάνι ο πράσινος ήταν τοξικός στα 400 µg/ml και ο καβουρδισμένος στα 100 µg/ml. Ούτε εδώ παρατηρήθηκε αύξηση βιωσιμότητας.

Τα συγκριτικά αποτελέσματα όλων των εκχυλισμάτων και στις δύο κυτταρικές σειρές φαίνονται στον πίνακα 10:

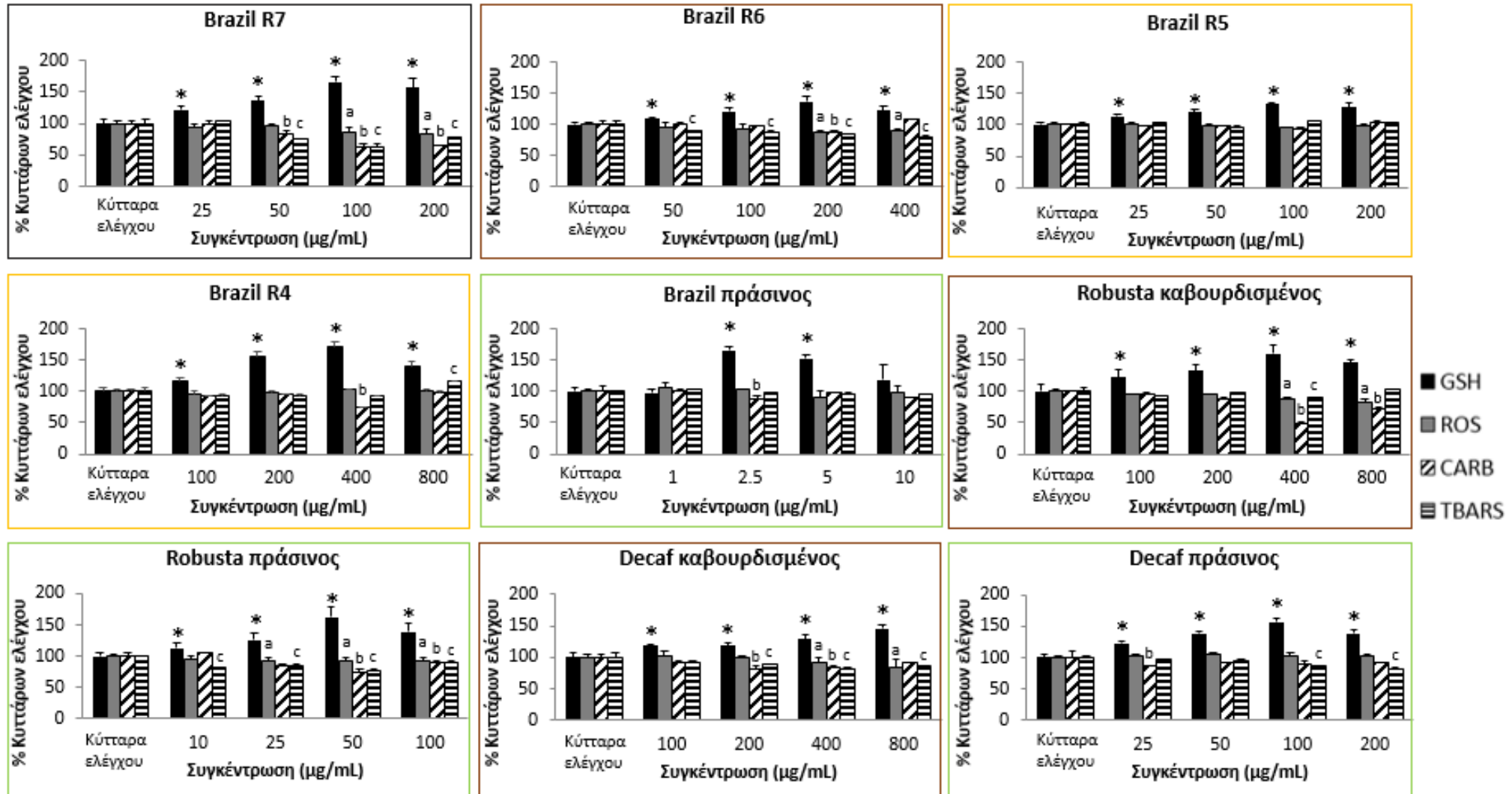
Πίνακας 10: Κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων καφέ στις δυο κυτταρικές σειρές

Εκχύλισμα καφέ	EA.hy926	C2C12
	Κυτταροτοξικότητα στα (μg/ml):	
Brazil R7	400	400
Brazil R6	100	800
Brazil R5	50	400
Brazil R4	400	1600
Brazil πράσινος	400	20
Robusta καβουρδισμένος	400	1600
Robusta πράσινος	200	200
Decaf καβουρδισμένος	100	1600
Decaf πράσινος	400	400

Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύγκριση των δύο κυτταρικών σειρών δείχνει ότι οι μυοβλάστες είναι πιο ευαίσθητοι στα εκχυλίσματα πράσινου καφέ (απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος για την πρόκληση κυτταροτοξικότητας) σε σχέση με τα αντίστοιχα καβουρδισμένα, ειδικά στην περίπτωση της ποικιλίας Brazil. Διαφορετική εικόνα παρατηρήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στα εκχυλίσματα των καβουρδισμένων κόκκων από τις ποικιλίες του είδους *C. arabica* (Brazil και Decaf) σε σχέση με τα αντίστοιχα των πράσινων κόκκων. Αντιθέτως, για την ποικιλία Robusta (είδους *C. canephora*) τα αποτελέσματα ήταν παρεμφερή με αυτά των μυοβλαστών από την άποψη ότι το πράσινο εκχύλισμα ήταν πιο τοξικό από το καβουρδισμένο (αν και είχαν 4 φορές μικρότερη διαφορά συγκριτικά με τους μυοβλάστες). Αξιοσημείωτη είναι επίσης και η διαφοροποίηση της τοξικότητας αναλόγως με το βαθμό καβουρδίσματος της ποικιλίας Brazil και στις δυο κυτταρικές σειρές. Αναλυτικότερα, το ελαφρά καβουρδισμένο εκχύλισμα (R4) ήταν το λιγότερο τοξικό, ενώ η αύξηση του χρόνου ψησίματος οδήγησε σε αυξημένη τοξικότητα έναντι των κυττάρων. Από τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας επιλέχθηκαν οι τέσσερις μεγαλύτερες μη-τοξικές συγκεντρώσεις ώστε να χορηγηθούν στις κυτταρικές σειρές και να εκτιμηθεί η επίδραση που έχει ο καφές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων.

3.2.2 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, TBARS και CARB

3.2.2.1 C2C12



Διάγραμμα 11: Η επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ (Brazil, Robusta, Decaf) στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειώνης (GSH), δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), πρωτεϊνικής (CARB) και λιπιδικής (TBARS) οξειδωσης στους μυοβλάστες. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων ενώ τα υπόλοιπα αφορούν τους καβουρδισμένους κόκκους. Σε κάθε μέθοδο τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) για την κάθε μέθοδο υποδηλώνονται με (*) για την GSH, (a) για τις ROS, (b) για τα CARB και (c) για τις TBARS

Πίνακας 11: Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών

C2C12	Εκχύλισμα Καφέ (μg/ml)	GSH (%)	ROS (%)	CARB (%)	TBARS (%)
Brazil R7	25	↗ (21,3)	-	-	-
	50	↗ (36,1)	-	↘ (16,6)	↘ (24,9)
	100	↗ (65,9)	↘ (13,8)	↘ (36,8)	↘ (37,0)
	200	↗ (57,3)	↘ (15,8)	↘ (36,0)	↘ (22,1)
Brazil R6	50	↗ (8,9)	-	-	↘ (11,3)
	100	↗ (20,1)	-	-	↘ (13,5)
	200	↗ (36,2)	↘ (13,5)	↘ (12,9)	↘ (16,7)
	400	↗ (21,8)	↘ (9,6)	-	↘ (20,5)
Brazil R5	25	↗ (13,9)	-	-	-
	50	↗ (20,2)	-	-	-
	100	↗ (33,1)	-	-	-
	200	↗ (27,4)	-	-	-
Brazil R4	100	↗ (17,0)	-	-	-
	200	↗ (56,2)	-	-	-
	400	↗ (70,1)	-	↘ (24,9)	-
	800	↗ (40,1)	-	-	↗ (16,0)
Brazil πράσινος	1	-	-	-	-
	2,5	↗ (65,9)	-	↘ (12,5)	-
	5	↗ (51,9)	-	-	-
	10	-	-	-	-
Robusta καβουρδισμένος	100	↗ (22,8)	-	-	-
	200	↗ (33,1)	-	-	-
	400	↗ (60,5)	↘ (11,0)	↘ (51,5)	↘ (10,2)
	800	↗ (46,5)	↘ (17,6)	↘ (28,8)	-
Robusta πράσινος	10	↗ (12,7)	-	-	↘ (17,9)
	25	↗ (25,9)	↘ (7,0)	-	↘ (14,7)
	50	↗ (62,1)	↘ (6,5)	↘ (25,3)	↘ (23,2)
	100	↗ (38,9)	↘ (6,5)	↘ (10,6)	↘ (10,5)
Decaf καβουρδισμένος	100	↗ (17,9)	-	-	-
	200	↗ (18,3)	-	↘ (17,8)	↘ (12,1)
	400	↗ (28,8)	↘ (7,3)	↘ (15,2)	↘ (18,2)
	800	↗ (46,1)	↘ (15,1)	-	↘ (15,0)
Decaf πράσινος	25	↗ (22,3)	-	↘ (13,.)	-
	50	↗ (38,5)	-	-	-
	100	↗ (56,4)	-	-	↘ (14,0)
	200	↗ (38,6)	-	-	↘ (18,3)

Το διάγραμμα 11 και ο πίνακας 11 αποτυπώνουν το σύνολο των αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση των 9 εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυοβλαστών. Η εκτίμηση έγινε μέσω της μέτρησης τεσσάρων βιοδεικτών και πιο συγκεκριμένα των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω

κυτταρομετρίας ροής, καθώς και των επιπέδων της πρωτεϊνικής (CARB) και της λιπιδικής (TBARS) οξειδωσης φασματοφωτομετρικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλα τα εκχυλίσματα είχαν θετική επίδραση στους παραπάνω βιοδείκτες αν και παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Αναλυτικότερα, ένα κοινό σημείο όλων των εκχυλισμάτων ήταν η αύξηση στα επίπεδα της GSH που κυμάνθηκε από 33% έως και 70% στην υψηλότερη τιμή κάθε εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα καφέ με την μικρότερη επίδραση ήταν το Brazil R5 ενώ το δραστικότερο ήταν το Brazil R4. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι 7 από τα 9 εκχυλίσματα προκάλεσαν αύξηση της GSH της τάξης του 50-70% ενώ μόνο τα εναπομείναντα 2 (Brazil R5 και R6) είχαν μικρότερη επίδραση (της τάξης του 33-36%). Επιπρόσθετα, σε 8 από τα 9 εκχυλίσματα η αύξηση στα επίπεδα GSH δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση μέχρι ενός μέγιστου σημείου και στη συνέχεια η χορήγηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης είχε ως μικρότερη επίδραση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης. Μόνη εξαίρεση ήταν ο καβουρδισμένος ντεκαφεϊνέ καθώς η αύξηση στα επίπεδα της GSH που προκάλεσε ήταν δοσοεξαρτώμενη.

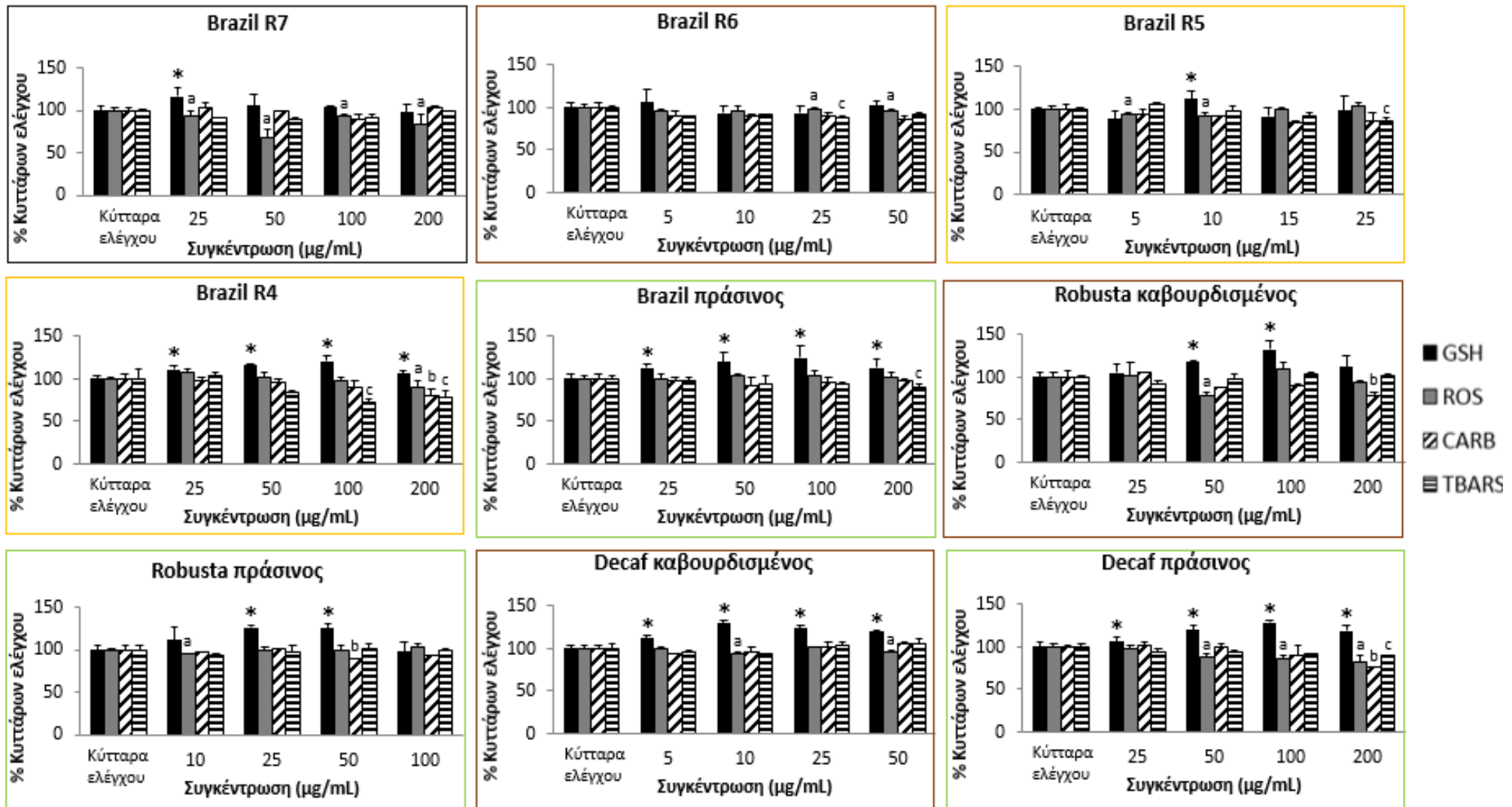
Αναλογικά με τη συγκέντρωση, το ισχυρότερο εκχύλισμα ήταν το πράσινο Brazil καθώς προκάλεσε αύξηση της GSH κατά 65,9% σε συγκέντρωση μόλις 2,5 μg/ml, η οποία ήταν 40-160 φορές μικρότερη από τη συγκέντρωση που απαιτήθηκε από τα αντίστοιχα καβουρδισμένα εκχυλίσματα της ίδιας ποικιλίας για να επιτύχουν τη μέγιστη αύξηση GSH. Όσον αφορά την ποικιλία Robusta, τόσο το πράσινο όσο και το καβουρδισμένο εκχύλισμα είχαν παρεμφερή επίδραση στη γλουταθειόνη, ωστόσο το πρώτο χορηγήθηκε σε 8 φορές μικρότερη συγκέντρωση για να το επιτύχει αυτό (50 έναντι 400 μg/ml). Στην ποικιλία ντεκαφεϊνέ, ξανά τα δυο εκχυλίσματα είχαν παρεμφερή επίδραση στην GSH, ωστόσο το πράσινο χρειάστηκε 8 φορές μικρότερη συγκέντρωση για να επιτύχει το μέγιστο αποτέλεσμα. Φυσικά, οι διαφορές αυτές οφείλονται στα διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας μεταξύ των εκχυλισμάτων που επέτρεψαν τη χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανά εκχύλισμα.

Σχετικά με τις ROS, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα είχαν μικρότερη επίδραση συγκριτικά με τη GSH. Μόλις σε 5 από τα 9 εκχυλίσματα παρατηρήθηκε κάποια μείωση στις ROS με τη μεγαλύτερη να φτάνει το 17,6% (Robusta καβουρδισμένος, 800 μg/ml). Αξιοσημείωτη στην ποικιλία Brazil ήταν η αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS αναλογικά με τη διάρκεια καβουρδίσματος, καθώς τα δύο ελαφρά καβουρδισμένα δείγματα δεν παρουσίασαν κάποια μείωση των ROS, ωστόσο τα R6 και R7 εμφάνισαν μειώσεις της τάξης του 13,5 και 15,8%,

αντίστοιχα. Ακόμα μια κοινή παρατήρηση και στις τρεις ποικιλίες ήταν η μεγαλύτερη ικανότητα μείωσης των ROS στα καβουρδισμένα εκχυλίσματα συγκριτικά με τα αντίστοιχα πράσινα.

Αναφορικά με τους δύο βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδωτικής βλάβης των βιομορίων, τα εκχυλίσματα καφέ είχαν προστατευτική δράση σε αρκετές περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν μειώσεις στην οξείδωση των πρωτεϊνών που έφτασαν το 51,5% (Robusta καβουρδισμένος στα 400 µg/ml) ενώ η αντίστοιχη τιμή μείωσης για τη λιπιδική υπεροξείδωση ήταν 37,0% (Brazil R7 στα 100 µg/ml). Με βάση τα αποτελέσματα, το καβούρδισμα ενίσχυσε τις προστατευτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων του καφέ στις δυο ποικιλίες του είδους *C. arabica*, ενώ δε βρέθηκαν διαφορές στην ποικιλία Robusta. Επιπλέον, παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση της προστατευτική ικανότητας καθώς τα περισσότερα καβουρδισμένα δείγματα (R6 και R7) ήταν πιο ισχυρά σε σχέση με τα ελαφρώς καβουρδισμένα (R4 και R5) της ποικιλίας Brazil.

3.2.2.2 EA.hy926



Διάγραμμα 12: Η επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ (Brazil, Robusta, Decaf) στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), πρωτεϊνικής (CARB) και λιπιδικής (TBARS) οξείδωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων ενώ τα υπόλοιπα αφορούν τους καβουρδισμένους κόκκους. Σε κάθε μέθοδο τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) για την κάθε μέθοδο υποδηλώνονται με (*) για την GSH, (a) για τις ROS, (b) για τα CARB και (c) για τις TBARS

Πίνακας 12: Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων

EA.hy926	Εκχύλισμα Καφέ (µg/ml)	GSH (%)	ROS (%)	CARB (%)	TBARS (%)
Brazil R7	25	↗ (16,3)	↘ (7,7)	-	-
	50	-	↘ (32,3)	-	-
	100	-	↘ (7,7)	-	-
	200	-	↘ (17,4)	-	-
Brazil R6	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	25	-	↘ (7,0)	-	↘ (12,4)
	50	-	↘ (7,2)	-	-
Brazil R5	5	-	↘ (5,5)	-	-
	10	↗ (12,1)	↘ (7,9)	-	-
	15	-	-	-	-
	25	-	-	-	↘ (13,4)
Brazil R4	25	↗ (11,4)	-	-	-
	50	↗ (15,6)	-	-	-
	100	↗ (20,9)	-	-	↘ (28,3)
	200	↗ (10,0)	↘ (9,3)	↘ (20,5)	↘ (22,1)
Brazil πράσινος	25	↗ (12,8)	-	-	-
	50	↗ (19,5)	-	-	-
	100	↗ (24,4)	-	-	-
	200	↗ (13,1)	-	-	↘ (10,7)
Robusta καβουρδισμένος	25	-	-	-	-
	50	↗ (19,1)	↘ (21,1)	-	-
	100	↗ (32,7)	-	-	-
	200	-	-	↘ (21,0)	-
Robusta πράσινος	10	-	↘ (5,5)	-	-
	25	↗ (26,0)	-	-	-
	50	↗ (25,2)	-	↘ (10,4)	-
	100	-	-	-	-
Decaf καβουρδισμένος	5	↗ (12,0)	-	-	-
	10	↗ (29,2)	↘ (5,3)	-	-
	25	↗ (23,3)	-	-	-
	50	↗ (20,0)	↘ (5,0)	-	-
Decaf πράσινος	25	↗ (8,0)	-	-	-
	50	↗ (19,5)	↘ (12,4)	-	-
	100	↗ (28,6)	↘ (13,3)	-	-
	200	↗ (19,0)	↘ (17,2)	↘ (24,5)	↘ (11,1)

Το παραπάνω διάγραμμα και ο πίνακας παρουσιάζουν το σύνολο των επιδράσεων των εκχυλισμάτων καφέ στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνολικά, παρατηρήθηκε μειωμένη επίδραση σε σχέση με τα αποτελέσματα στους μυοβλάστες. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα γλουταθειόνης αυξήθηκαν από τα περισσότερα εκχυλίσματα (8 στα

9), ωστόσο τα επίπεδα αύξησης δεν υπερέβησαν το 32,7% (Robusta καβουρδισμένος στα 100 µg/ml). Το μόνο εκχύλισμα που δεν επηρέασε τη γλουταθειόνη ήταν το Brazil R6. Οι μέγιστες τιμές αύξησης της GSH ανά εκχύλισμα ήταν 24,4% για το πράσινο Brazil (100 µg/ml), 20,9% για το R4 (100 µg/ml), 12,1% για το R5 (10 µg/ml), 26,0% για το πράσινο Robusta (25 µg/ml), 28,6% για το πράσινο Decaf (100 µg/ml) και 29,2% για το καβουρδισμένο Decaf (10 µg/ml). Όπως και στους μυοβλάστες, παρατηρήθηκε μία κορυφή στα επίπεδα αύξησης της γλουταθειόνης, ενώ η χορήγηση υψηλότερων συγκεντρώσεων οδηγούσε σε μείωση των επιπέδων της.

Ως προς τις ROS, ήταν ο μόνος δείκτης όπου παρουσιάστηκε ισχυρότερη επίδραση συγκριτικά με τους μυοβλάστες. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα εκχυλίσματα οδήγησαν σε μείωση των ριζών που έφτασε και το 32,3% (Brazil R7, 50 µg/ml). Όπως και στους μυοβλάστες, παρατηρείται αυξημένη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών στα καβουρδισμένα εκχυλίσματα αν και εξαίρεση σε αυτό αποτελεί η ποικιλία Decaf, όπου ο άψητος καφές μείωσε περισσότερο τις ROS (17,2%) σε σχέση με τον ψημένο (5,3%). Παρ' όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι η μείωση του καβουρδισμένου εκχυλίσματος παρατηρήθηκε σε 20 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με το πράσινο (10-200µg/ml). Παρ' όλα αυτά, στα 50µg/ml όπου εξετάστηκαν και οι δυο καφέδες ο πράσινος μείωσε τις ROS κατά 12,4% ενώ ο καβουρδισμένος μόνο κατά 5,0%. Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου καβουρδίσματος, τα τρία πιο ελαφρά καβουρδισμένα εκχυλίσματα της ποικιλίας Brazil είχαν παρεμφερή δράση, ωστόσο το R7 παρουσίασε ισχυρότερη ικανότητα μείωσης των ROS.

Η οξειδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων μειώθηκε σε κάποιες περιπτώσεις, όχι όμως στο εύρος που αυτό έγινε στους μυοβλάστες. Μόλις σε 4 εκχυλίσματα καφέ παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μάλιστα μόνο σε μία συγκέντρωση ανά περίπτωση. Αναλυτικότερα, το εκχύλισμα Brazil R4 μείωσε τα καρβονύλια κατά 20,5% στα 200 µg/ml. Στα εκχυλίσματα Robusta, τόσο το πράσινο όσο και το καβουρδισμένο μείωσαν την οξειδωση των πρωτεϊνών κατά 10,4% και 21%, στα 50 και 200 µg/ml αντίστοιχα. Όσο για την τρίτη ποικιλία (Decaf), μόνο το πράσινο εκχύλισμα εμφάνισε κάποια επίδραση μειώνοντας τα καρβονύλια στα 200 µg/ml κατά 24,5%.

Από την άλλη, μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων παρατηρήθηκε σε 5 εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα πράσινου Brazil μείωσε τα TBARS κατά 10,7% στη μεγαλύτερη χορηγούμενη συγκέντρωση (200 µg/ml). Το ελαφρά καβουρδισμένο (R4) προκάλεσε μείωση κατά 28,3 και 22,1% στα 100 και 200 µg/ml αντίστοιχα ενώ τα R5 και R6 μείωσαν την οξειδωση

λιπιδίων κατά 13,4 και 12,4% στα 25 µg/ml και στις δυο περιπτώσεις. Τέλος, το Decaf πράσινο οδήγησε σε μείωση κατά 11,1% στα 200 µg/ml.

3.2.3 Αποτελέσματα αποτίμησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών

Σύμφωνα με τις μικροσυστοιχιές, η χορήγηση του Brazil R4 στους μυοβλάστες στη συγκέντρωση των 400 µg/ml οδήγησε σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης συνολικά 36 γονιδίων, οδηγώντας σε υπερέκφραση 35 και υποέκφραση ενός, σύμφωνα με τον πίνακα 13:

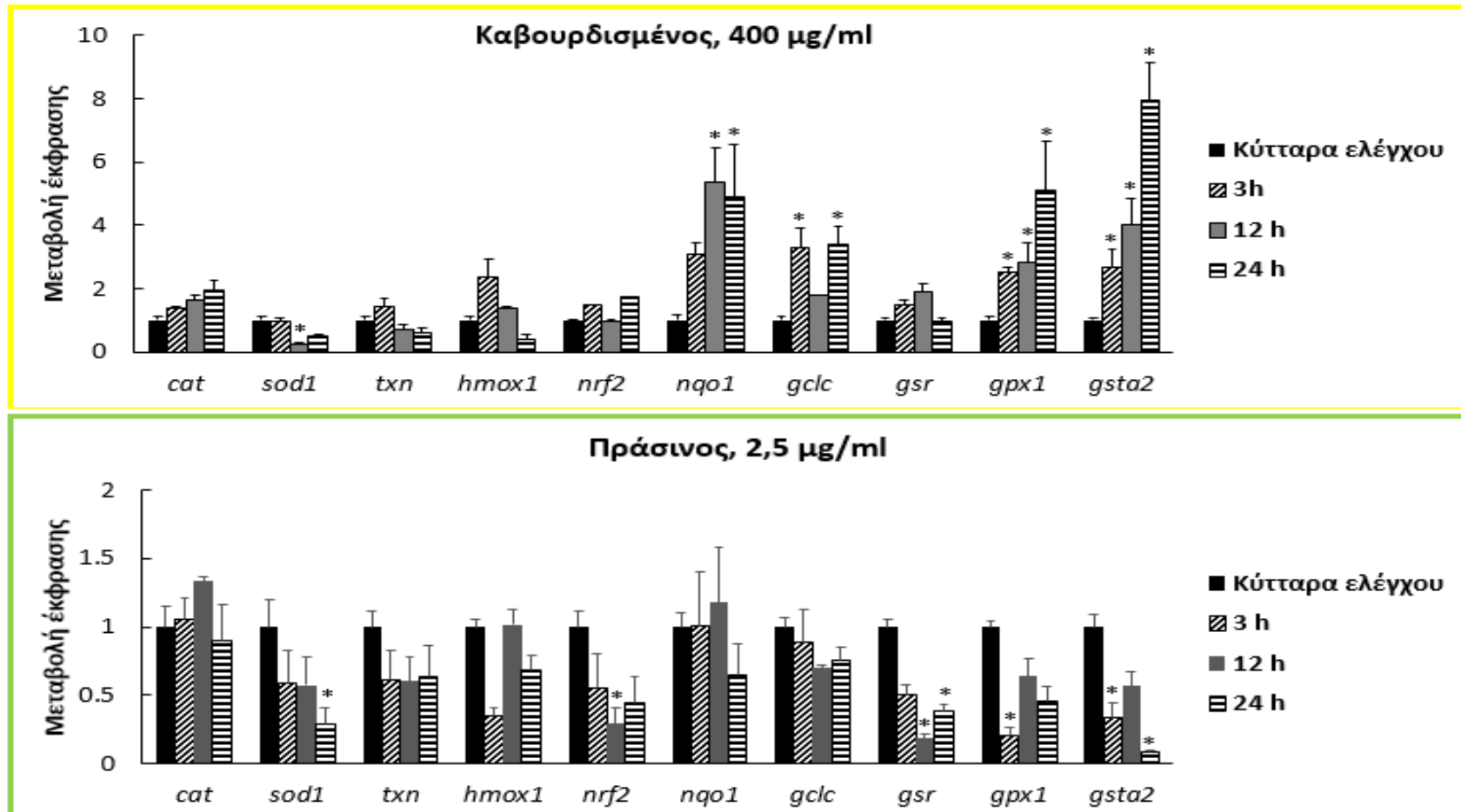
Πίνακας 13: Επίδραση του εκχυλίσματος Brazil R4 (400 µg/ml) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων των μυοβλαστών

Εκχύλισμα	Σύμβολο γονιδίου	Γονίδιο	Μεταβολή έκφρασης
Brazil R4	<i>Plf</i>	<i>prolactin family 2, subfamily c, member 2</i>	2,56
	<i>Gsta2</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 2</i>	2,49
	<i>Aldh3a1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1</i>	2,18
	<i>Gsta1</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 1</i>	2,13
	<i>Nqo1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	2,02
	<i>Cyp1b1</i>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily b</i>	2,01
	<i>Gpr176</i>	<i>G-protein coupled receptor 176</i>	1,96
	<i>Gsta4</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 4</i>	1,87
	<i>Ccl9</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 9</i>	1,85
	<i>Gstm1</i>	<i>glutathione S-transferase, mu 1</i>	1,72
	<i>Rnu6</i>	<i>U6 small nuclear RNA</i>	1,69
	<i>Psm12</i>	<i>proteasome 26S subunit, non-ATPase, 12</i>	1,68
	<i>Ugt1a9</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase family 1 member A9</i>	1,68
	<i>Mgst2</i>	<i>microsomal glutathione S-transferase 2</i>	1,68
	<i>Plf3</i>	<i>prolactin family 2, subfamily c, member 4</i>	1,66
	<i>Fez1</i>	<i>fasciculation and elongation protein zeta 1</i>	1,64
	<i>Ugt1a10</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase family 1 member A10</i>	1,63
	<i>Plf2</i>	<i>prolactin family 2, subfamily c, member 3</i>	1,63
	<i>Ogn</i>	<i>osteoglycin</i>	1,63
	<i>Fam180a</i>	<i>family with sequence similarity 180, member A</i>	1,63
	<i>Tmem45a</i>	<i>transmembrane protein 45a</i>	1,62
	<i>LOC235860</i>	<i>predicted gene 5165</i>	1,61
	<i>Plscr2</i>	<i>phospholipid scramblase 2</i>	1,60
	<i>Mgp</i>	<i>matrix Gla protein</i>	1,58
	<i>LOC329575</i>	-	1,58
	<i>Txn1</i>	<i>thioredoxin 1</i>	1,58
	<i>Csda</i>	<i>Y box protein 3</i>	1,58
	<i>Aqp5</i>	<i>aquaporin 5</i>	1,56
	<i>Nnmt</i>	<i>nicotinamide n-methyltransferase</i>	1,55
	<i>Psme2b</i>	<i>proteasome activator subunit 2 (PA28 beta)</i>	1,54
	<i>Lgals3bp</i>	<i>lectin, galactoside-binding, 3 binding protein</i>	1,54
	<i>8430408G22Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 8430408G22 gene</i>	1,52
	<i>Esd</i>	<i>esterase d</i>	1,51
<i>Ccl7</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 7</i>	1,51	
<i>Slc40a1</i>	<i>solute carrier family 40 member 1</i>	1,51	
<i>Ccdc134</i>	<i>coiled-coil domain containing 134</i>	0,47	

3.2.4 Αποτελέσματα αποτίμησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω real-time PCR

3.2.4.1 C2C12

Τα εκχυλίσματα πράσινου και ελαφρά καβουρδισμένου (R4) Brazil επιλέχθηκαν για τη μελέτη της επίδρασής τους στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και συγκεκριμένα με το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Η συγκέντρωση που χορηγήθηκαν αντιστοιχούσε σε αυτήν με τη μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα της χορήγησης τους στους μυοβλάστες φαίνονται στο Διάγραμμα 13:



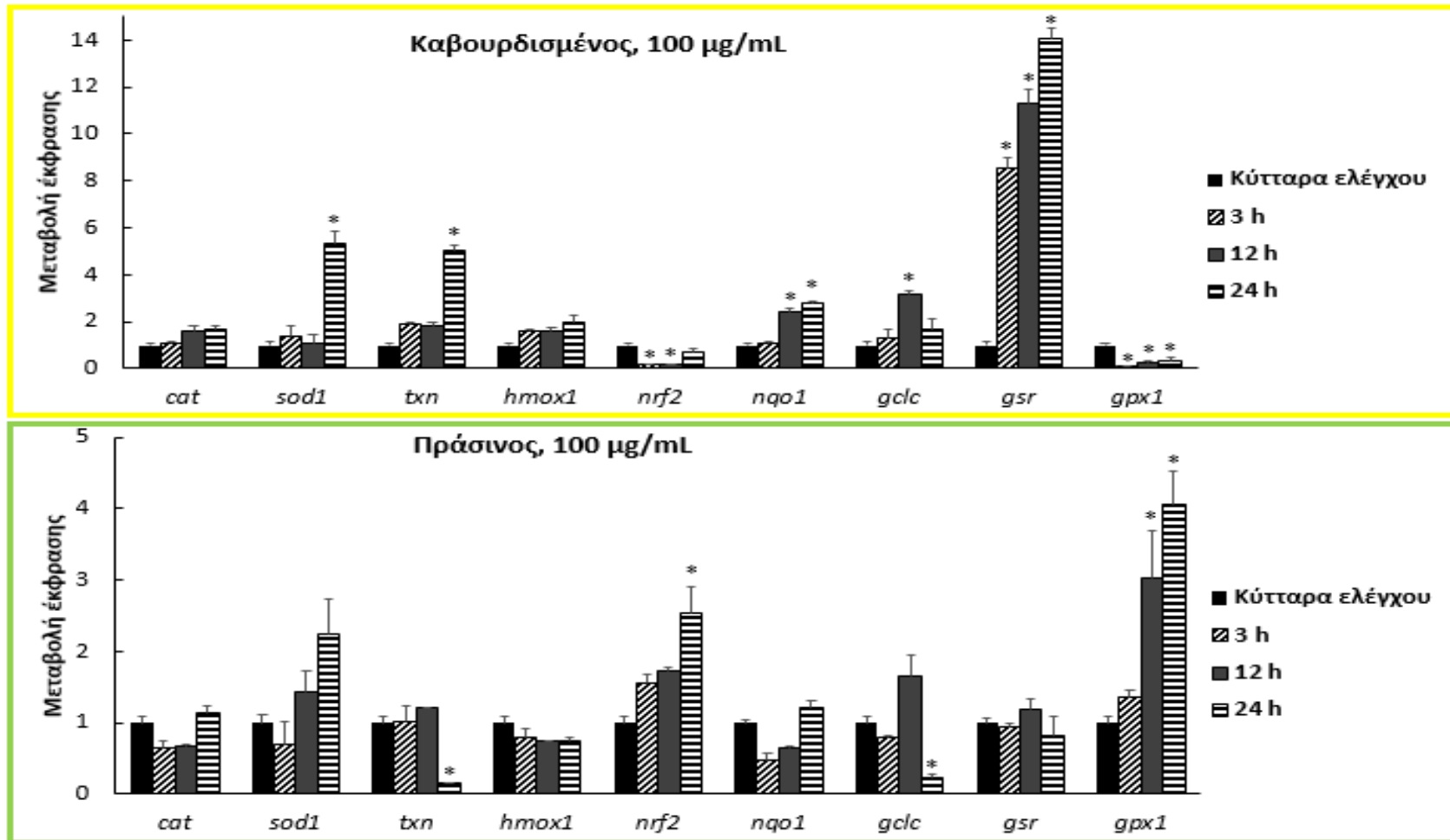
Διάγραμμα 13: Επίδραση των εκχυλισμάτων Brazil R4 και πράσινου στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στους μυοβλάστες. Φαίνεται η επίδραση των εκχυλισμάτων σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), ενώ ως γονίδιο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το *gapdh*. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων ελέγχου.

Το καβουρδισμένο εκχύλισμα είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για την υπεροξειδική δισμουτάση (*sod1*), την NADPH οξειδοαναγωγή των κινονών (*nqo1*), την καταλυτική υπομονάδα της γ-γλουταμυλοκουστεϊνικής λιγάσης, την περοξειδάση της γλουταθειόνης 1 (*gclc*) και την α2 S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*gsta2*), μειώνοντας την έκφραση του πρώτου και αυξάνοντας τα υπόλοιπα. Αναλυτικότερα, η έκφραση του *sod1* μειώθηκε κατά 78% έπειτα από 12 h χορήγησης συγκριτικά με τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου (στα οποία δεν χορηγήθηκε το εκχύλισμα). Αντιθέτως, τα επίπεδα του *nqo1* αυξήθηκαν κατά 5,4- και 4,9-φορές στις 12h και 24h αντίστοιχα. Το *gclc* παρουσίασε διακυμάνσεις καθώς αυξήθηκε κατά 3,3-φορές στις 3h και 3,4-φορές στις 24h. Αύξηση είχαν και τα επίπεδα του *gpx1* κατά 2,5 φορές στις 3h, 2,8 φορές στις 12h και 5,1 φορές στις 24h, ενώ το *gsta2* παρουσίασε επαγωγή έκφρασης κατά 2,7 φορές στις 3h, 4 φορές στις 12h και 7,9 φορές στις 24h. Τα υπόλοιπα γονίδια (*cat*, *txn*, *ho-1*, *nrf2* και *gsr*) δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης τους.

Η χορήγηση του πράσινου καφέ είχε διαφορετικά αποτελέσματα, καθώς μειώθηκε σημαντικά η έκφραση έξι γονιδίων (*sod1*, *txn*, *hmox1*, *nrf2*, *gsr*, *gpx1* και *gsta2*) χωρίς να αυξηθούν τα επίπεδα κάποιου. Αναλυτικότερα, μειώθηκε το *sod1* κατά 71% στις 24h, το *hmox1* στις 3h κατά 65%, το *nrf2* στις 12h κατά 71%, το *gsr* μειώθηκε κατά 82% στις 12h και κατά 62% στις 24h, το *gpx1* στις 3h κατά 80% και τέλος το *gsta2* κατά 67% στις 3h και κατά 91% στις 24h. Στα επίπεδα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων (*cat*, *txn*, *nqo1* και *gclc*) δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.2.4.2 EA.hy926

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα χορήγησης των εκχυλισμάτων στα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνονται στο Διάγραμμα 14:



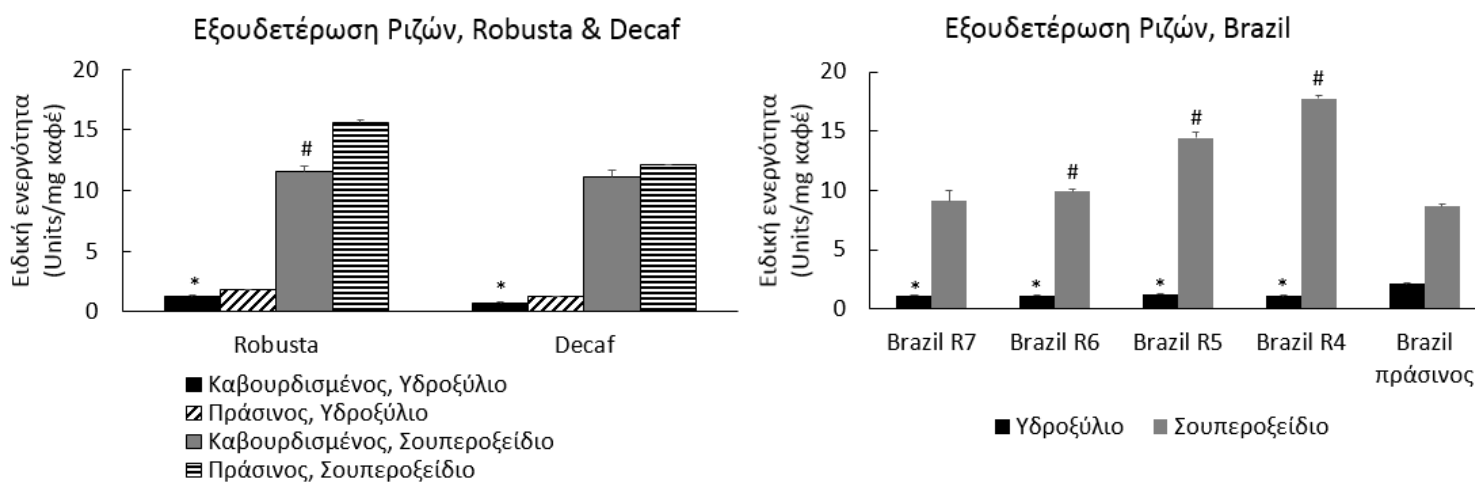
Διάγραμμα 14: Επίδραση των εκχυλισμάτων Brazil R4 και πράσινου στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Φαίνεται η επίδραση των εκχυλισμάτων σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (3 h, 12 h, 24 h). Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί τόσο ως προς τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων ελέγχου (που δεν έλαβαν εκχύλισμα), ενώ ως γονίδιο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το *gapdh*. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων ελέγχου.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η χορήγηση καβουρδισμένου καφέ στα 100 μg/ml οδήγησε σε αύξηση έκφρασης του γονιδίου *sod1* στις 24h κατά 5,3 φορές, του *txn* στις 24h κατά 5 φορές, του *nqo1* στις 12h και 24h κατά 2,4 και 2,8 φορές αντίστοιχα, του γονιδίου *gclc* στις 12h κατά 3,2 φορές και του *gsr* κατά 8,5, 11,3 και 13,9 φορές στις 3h, 12h και 24h αντίστοιχα. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μείωση του *gpx1* κατά 92% στις 3h, 75% στις 12h και 64% στις 24h και του *nrf2* κατά 84% στις 12h και 85% στις 24h.

Ο πράσινος καφές (και αυτός στα 100 μg/ml) οδήγησε σε αύξηση του *nrf2* στις 24h κατά 2,5 φορές και του *gpx1* στις 12h και 24h κατά 3 και 4 φορές αντίστοιχα. Αντίθετα, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του γονιδίου *txn* στις 24h κατά 86% και του *gclc* στις 24h κατά 77%.

3.2.5 Εξουδετέρωση ριζών σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και υδροξυλίου (HO[•])

Εκτός των κυτταρικών σειρών, τα 9 εκχυλίσματα εξετάστηκαν και ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου και σουπεροξειδίου (δύο από τις κύριες φυσιολογικά παραγόμενες δραστικές μορφές, βλέπε [1.3](#)) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15:



Διάγραμμα 15: Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ (Brazil, Robusta, Decaf) να εξουδετερώνουν τις ρίζες σουπεροξειδίου και υδροξυλίου. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως ειδική ενεργότητα του κάθε εκχυλίσματος. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων πράσινων και καβουρδισμένων κόκκων υποδηλώνονται με (*) για την μέθοδο του υδροξυλίου και (#) για τη μέθοδο του σουπεροξειδίου.

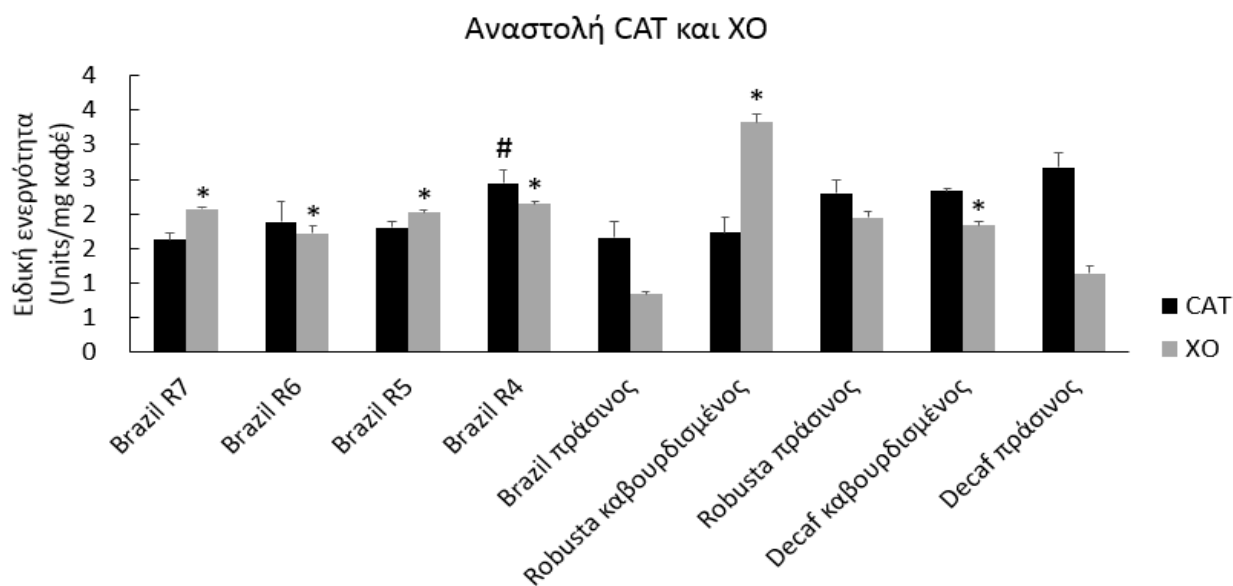
Με βάση τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα καφέ εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου συγκριτικά με τη ρίζα υδροξυλίου από 4,2 έως και 16,5 φορές περισσότερο. Για τη ρίζα υδροξυλίου τα εκχυλίσματα είχαν 0,74 (Decaf καβουρδισμένος) έως και 2,16 (Brazil πράσινος) μονάδες ειδικής ενεργότητας. Και στις τρεις ποικιλίες το εκχύλιμα

πράσινου καφέ επέδειξε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας, ενώ ο χρόνος καβουρδίσματος στην ποικιλία Brazil δεν επηρέασε την δραστικότητα (1,12, 1,28, 1,15 και 1,15 μονάδες για 4, 5, 6 και 7 λεπτά καβουρδίσματος αντίστοιχα συγκριτικά με τις 2,16 μονάδες του πράσινου). Στις ποικιλίες Robusta και Decaf, τα εκχυλίσματα πράσινων καφέδων είχαν 1,82 και 1,23 μονάδες, ενώ τα αντίστοιχα καβουρδισμένα 1,30 και 0,74 μονάδες.

Στη ρίζα σουπεροξειδίου, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστικότητας λόγω του καβουρδίσματος (από 15,59 στο πράσινο σε 11,62 μονάδες στο ψημένο) στον Robusta. Στον Decaf το καβούρδισμα δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστικότητα (από 12,15 μονάδες στο πράσινο εκχύλισμα, σε 11,16 στο καβουρδισμένο). Ωστόσο, στην ποικιλία Brazil το ελαφρύ καβούρδισμα αύξησε κατά πολύ την ικανότητα εξουδετέρωσης σουπεροξειδίου (από 8,68 μονάδες στο πράσινο σε 17,73 στο R4) η οποία πάντως μειώθηκε με το πέρασμα του χρόνου για να φτάσει στα ίδια επίπεδα με το πράσινο εκχύλισμα στο πιο καβουρδισμένο (R7).

3.2.6 Αναστολή δραστικότητας οξειδάσης της ξανθίνης (XO) και της καταλάσης (CAT)

Επιπρόσθετα, τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και της καταλάσης, με τα αποτελέσματα να απεικονίζονται στο Διάγραμμα 16:



Διάγραμμα 16: Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ (Brazil, Robusta, Decaf) να αναστέλλουν τη δραστικότητα των ενζύμων οξειδάση της ξανθίνης (γκρι μπάρες) και καταλάσης (μαύρες μπάρες). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως ειδική ενεργότητα του κάθε εκχυλίσματος. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων πράσινων και καβουρδισμένων κόκκων υποδηλώνονται με (*) για την οξειδάση της ξανθίνης και (#) για την καταλάση.

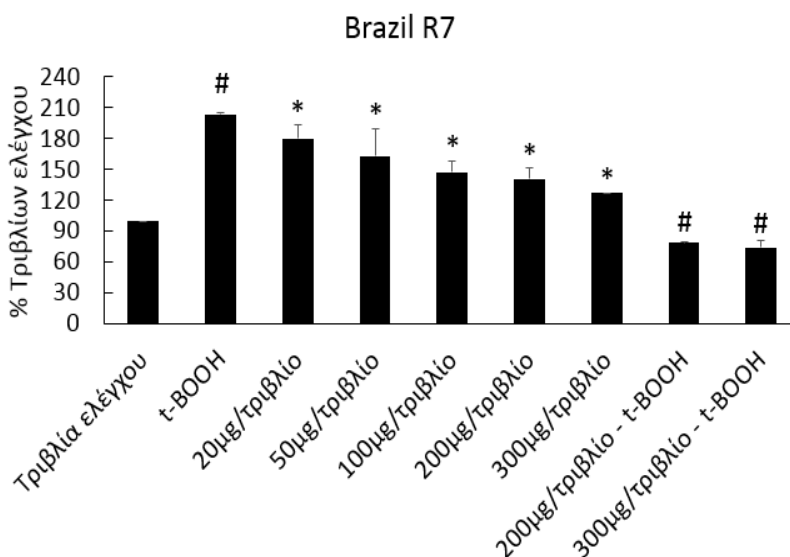
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα καφέ είχαν παρεμφερή ικανότητα αναστολής και των δύο ενζύμων. Αναλυτικότερα, όσον αφορά την οξειδάση της ξανθίνης η ειδική ενεργότητα είχε εύρος από 0,84 (Brazil πράσινος) ως 3,32 (Robusta καβουρδισμένος) μονάδες. Συνολικά, το καβούρδισμα είχε θετική επίδραση και στις τρεις ποικιλίες, αυξάνοντας την ικανότητα αναστολής του ενζύμου συγκριτικά με τα αντίστοιχα πράσινα εκχυλίσματα.

Αναφορικά με την αναστολή της καταλάσης, η ειδική ενεργότητα κυμάνθηκε από 1,62 (Brazil R7) έως και 2,67 (Decaf πράσινος) μονάδες. Το καβούρδισμα δεν επηρέασε την δραστηριότητα των εκχυλισμάτων, με μόνη εξαίρεση τον ελαφρά καβουρδισμένο Brazil (R4) που είχε στατιστικά σημαντικά αυξημένη ενεργότητα συγκριτικά με τον αντίστοιχο πράσινο καφέ κατά 47.6%

3.2.7 Τεστ του Ames

3.2.7.1 Τεστ του Ames χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση

Η επόμενη δοκιμασία αφορούσε την εκτίμηση της ικανότητας των εκχυλισμάτων καφέ να προστατεύουν το DNA βακτηρίων από μεταλλαξιγένεση λόγω του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (17-25):

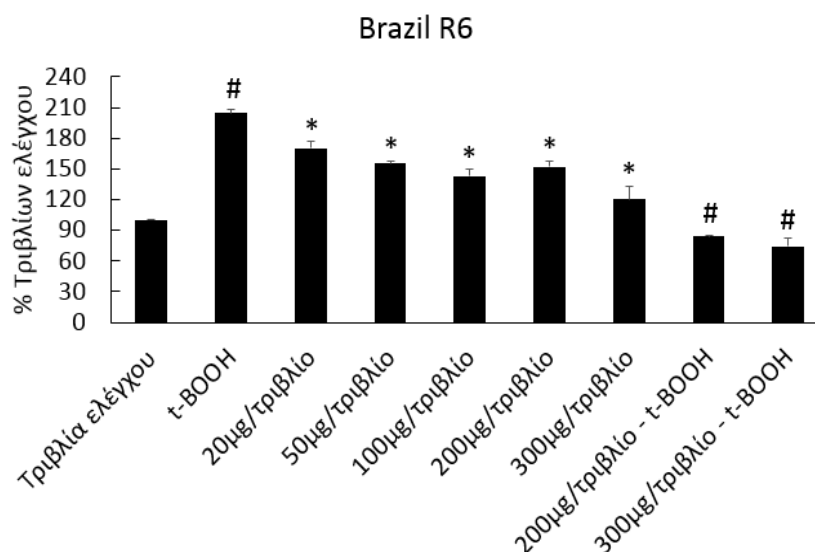


Διάγραμμα 17: Τεστ του Ames, Brazil R7. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε *t*-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).

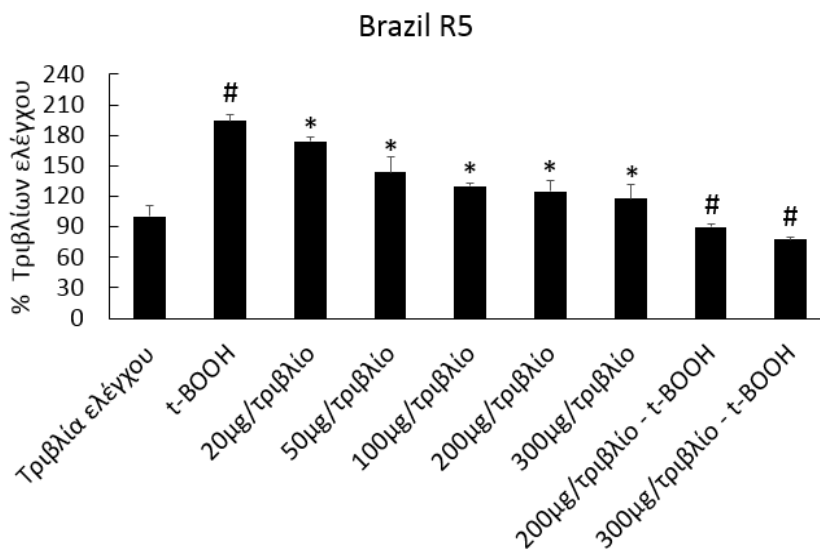
Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα (όπου απεικονίζεται ο αριθμός των παρατηρούμενων αποικιών), η χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα διπλασίασε τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με τα τριβλία ελέγχου (στα οποία δεν χορηγήθηκε *t*-BOOH).

Στα υπόλοιπα τριβλία όπου χορηγήθηκαν ταυτόχρονα ο οξειδωτικός παράγοντας και το εκχύλισμα καφέ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη μείωση των αποικιών σε σχέση με την ομάδα θετικού μάρτυρα (*t*-BOOH). Επιπρόσθετα, στα τριβλία όπου χορηγήθηκε εκχύλισμα καφέ χωρίς το *t*-BOOH, οι αποικίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τα τριβλία ελέγχου.

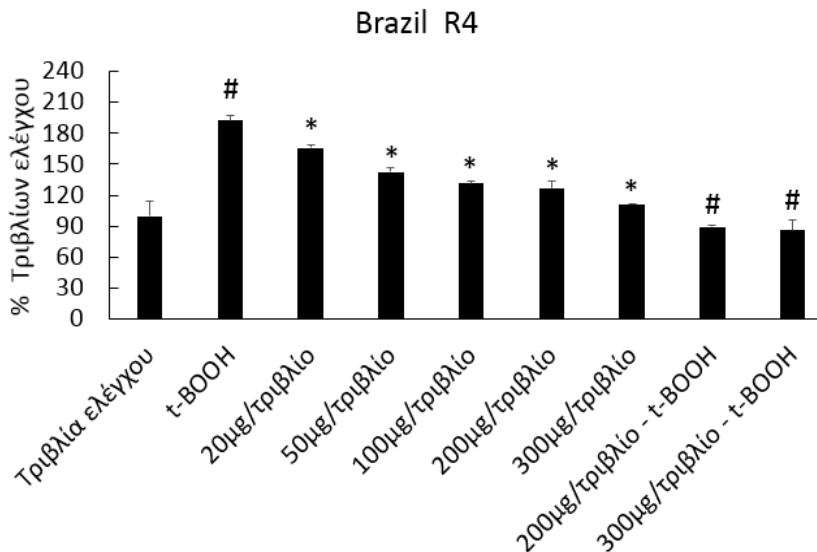
Παραμεφερή εικόνα παρατηρήθηκε και για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα καφέ όπως φαίνεται στα διαγράμματα 18-25:



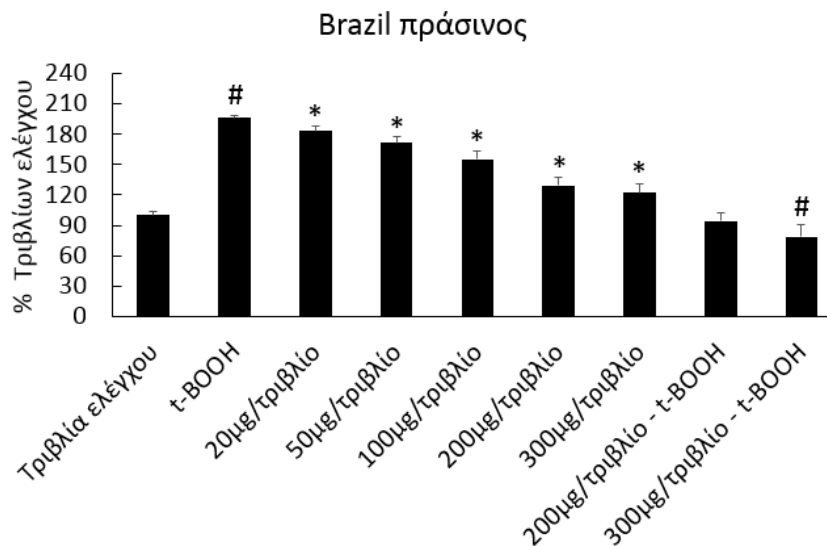
Διάγραμμα 18: Τεστ του Ames, **Brazil R6**. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε *t*-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



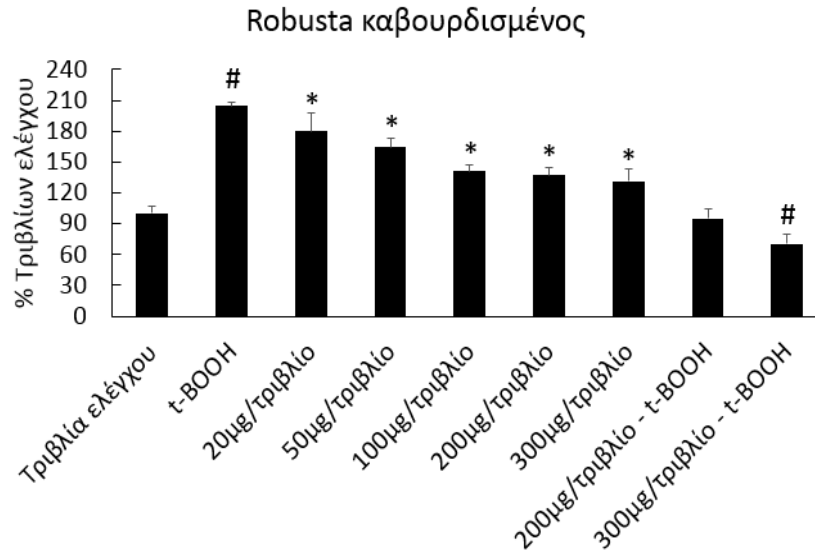
Διάγραμμα 19: Τεστ του Ames, Brazil R5. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



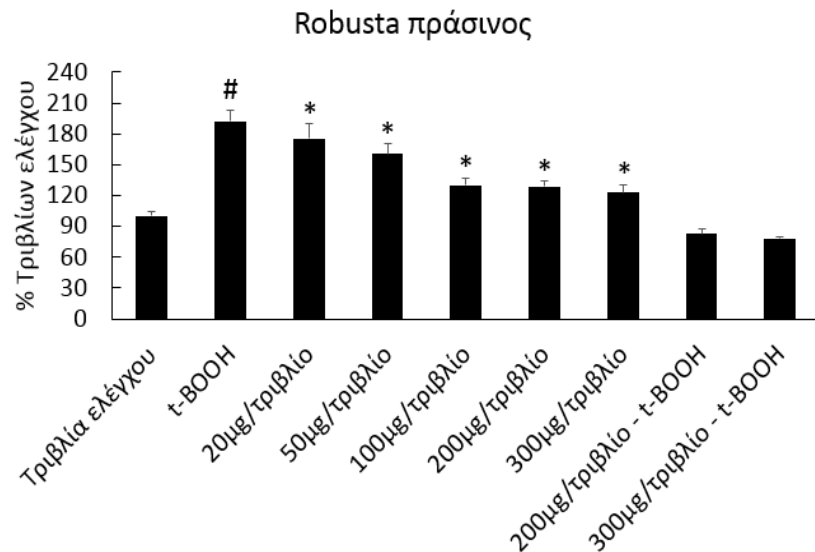
Διάγραμμα 20: Τεστ του Ames, Brazil R4. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



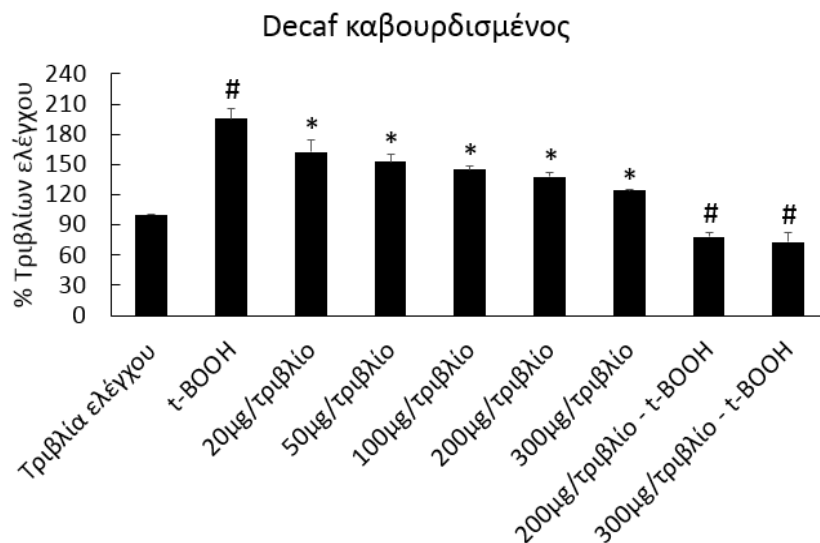
Διάγραμμα 21: Τεστ του Ames, Brazil πράσινος. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



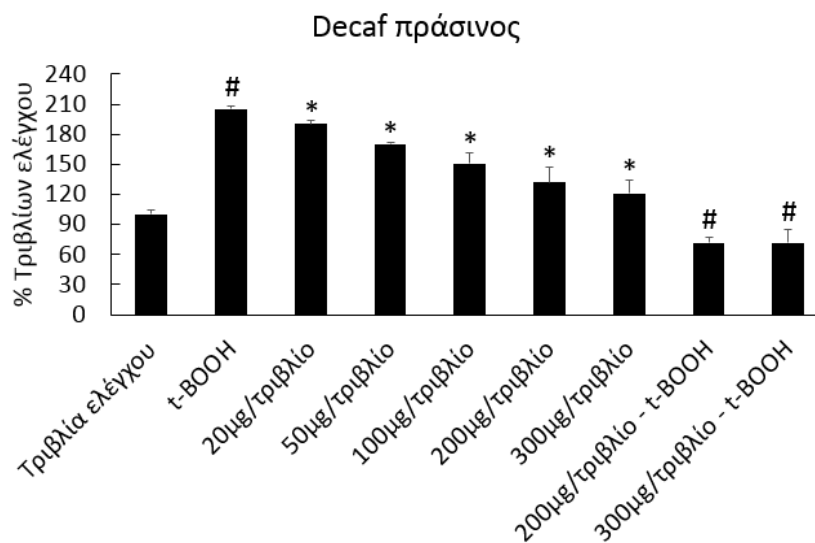
Διάγραμμα 22: Τεστ του Ames, Robusta καβουρδισμένος. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



Διάγραμμα 23: Τεστ του Ames, Robusta πράσινο. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



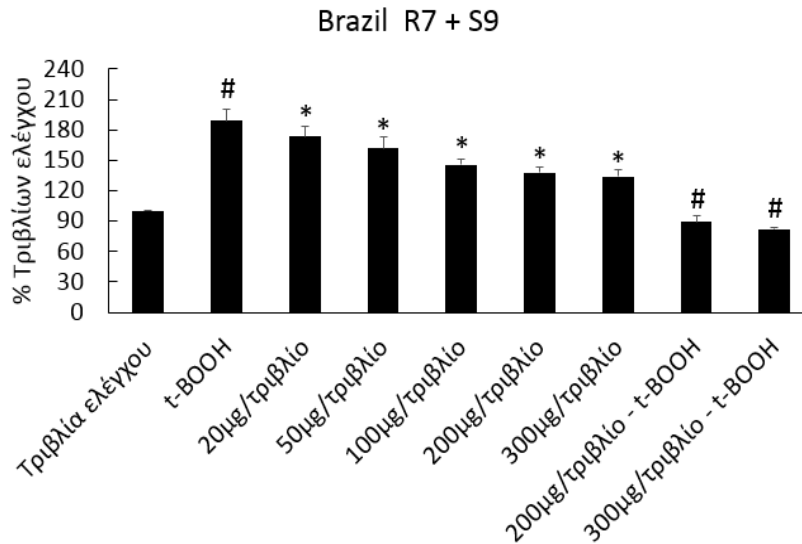
Διάγραμμα 24: Τεστ του Ames, Decaf καβουρδισμένος. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



Διάγραμμα 25: Τεστ του Ames, Decaf πράσινο. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).

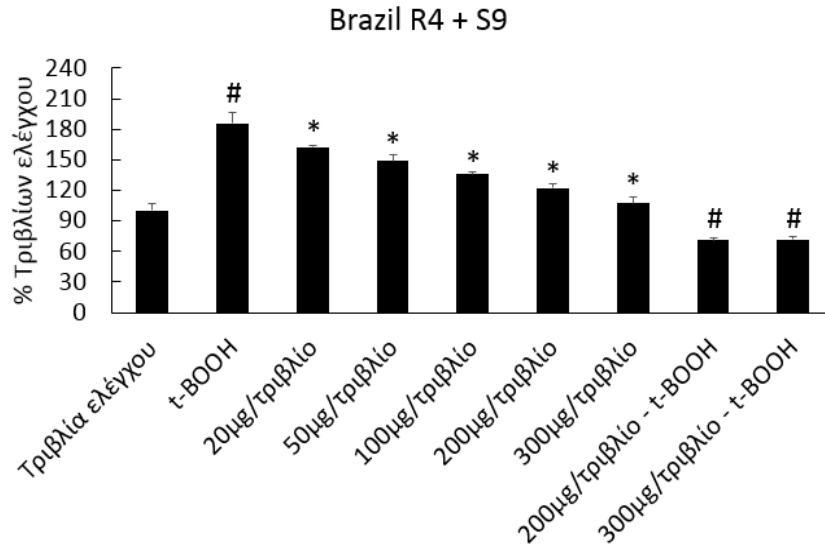
3.2.7.2 Τεστ του Ames με μεταβολική ενεργοποίηση

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο της μεταβολικής ενεργοποίησης των εκχυλισμάτων καφέ πριν τη χορήγησή τους στα βακτήρια. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τα εκχυλίσματα Brazil πράσινο, R4 και R7 και τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω:

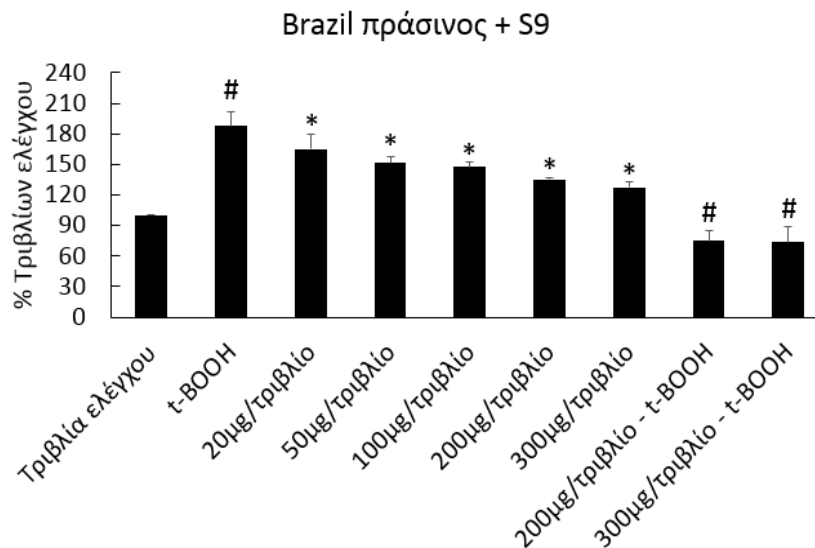


Διάγραμμα 26: Τεστ του Ames + S9 activation Brazil R7. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφές, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).

Όπως και στο πρώτο μέρος του τεστ του Ames (διαγράμματα 17-25), η χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα διπλασίασε τις παρατηρούμενες αποικίες σε σχέση με τα τριβλία ελέγχου (στα οποία δεν χορηγήθηκε t-BOOH). Στα υπόλοιπα τριβλία όπου χορηγήθηκαν ταυτόχρονα ο οξειδωτικός παράγοντας και το εκχύλισμα καφέ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση των αποικιών σε σχέση με την ομάδα θετικού μάρτυρα (t-BOOH). Επιπρόσθετα, στα τριβλία όπου χορηγήθηκε καφές χωρίς το t-BOOH, οι αποικίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τα τριβλία ελέγχου.

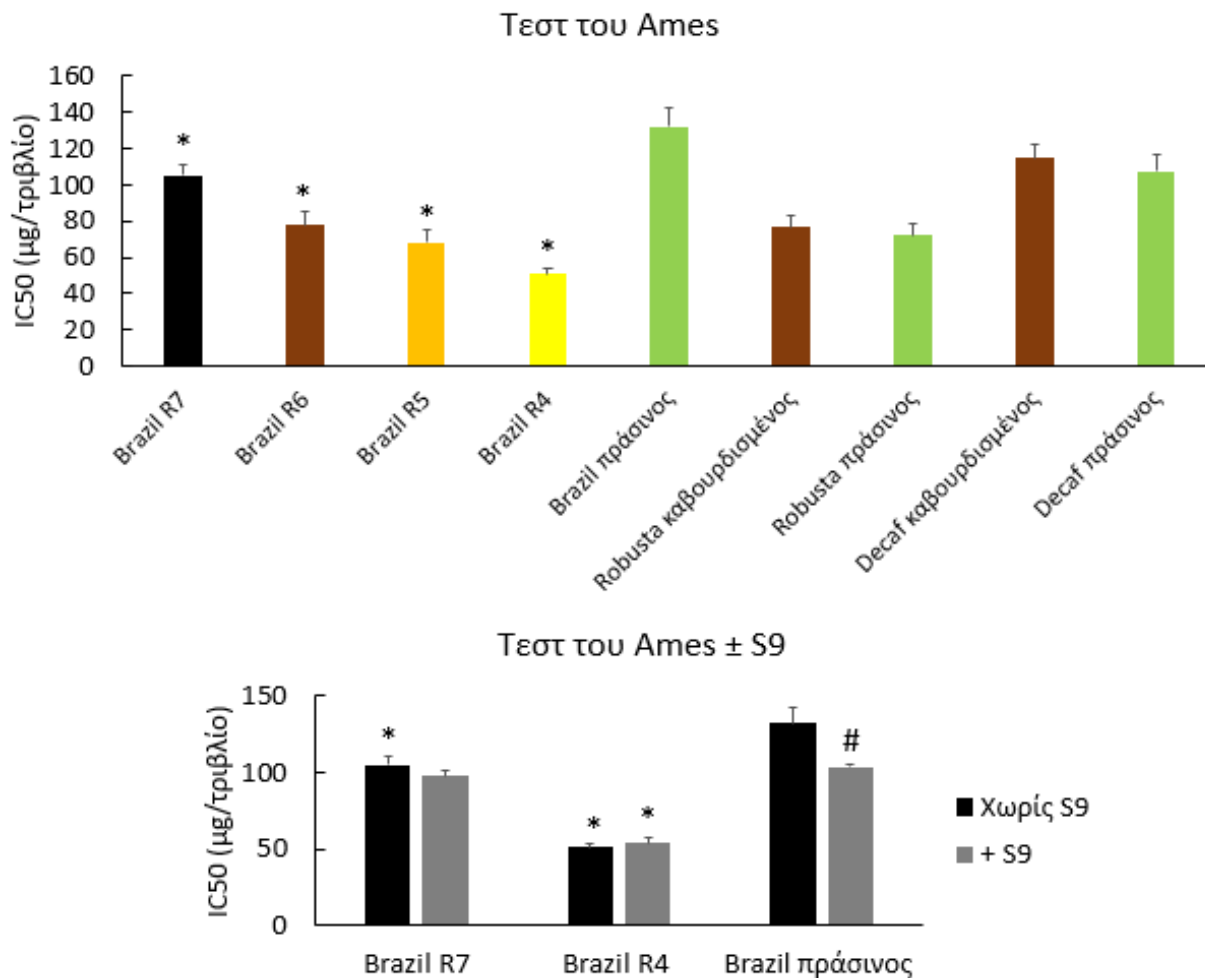


Διάγραμμα 27: Τεστ του Ames + S9 activation Brazil R4. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλιών ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφέ, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).



Διάγραμμα 28: Τεστ του Ames + S9 activation Brazil Πράσινος. Όλα τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες των τριβλιών ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε καφέ, ούτε t-BOOH) Με (#) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου, ενώ με (*) υποδηλώνεται διαφορά με τα τριβλία θετικού μάρτυρα (που έχει χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω διαγραμμάτων (υπό τη μορφή της τιμής IC_{50}) συνοψίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 29) ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ τους:



Διάγραμμα 29: Η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ (Brazil, Robusta, Decaf) σύμφωνα με το τεστ του Ames. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων πράσινων και καβουρδισμένων κόκκων υποδηλώνονται με (*), ενώ στο κάτω διάγραμμα οι διαφορές μεταξύ της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ενός εκχυλίσματος χωρίς και με το S9 σημειώνονται με (#).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση μειώνοντας σημαντικά τον αριθμό των μεταλλάξεων που προκαλούνται από τον οξειδωτικό παράγοντα *t*-BOOH. Οι τιμές IC₅₀ είχαν εύρος από 51,03 µg/ml (Brazil R4) έως και 132,29 µg/ml (Brazil πράσινος) ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η χαμηλότερη τιμή μεταφράζεται σε ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση του εκχυλίσματος. Αναλυτικότερα, στις ποικιλίες Robusta και Decaf το καβούρδισμα δεν επηρέασε τη δράση του καφέ, ωστόσο στην ποικιλία Brazil και τα 4 καβουρδισμένα εκχυλίσματα ήταν ισχυρότερα του πράσινου (με την αντιμεταλλαξιγόνο δράση να μειώνεται πάντως αναλογικά με το χρόνο καβουρδίσματος). Όσον αφορά το τεστ Ames μετά την μεταβολική ενεργοποίηση, τα δύο καβουρδισμένα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν (R4, R7) δεν επηρεάστηκαν από τη διεργασία με τα μεταβολικά ένζυμα, ωστόσο

το πράσινο Brazil εμφάνισε αυξημένη αντιμεταλλαξιγόνο δράση συγκριτικά με το μη μεταβολισμένο εκχύλισμα (αύξηση 26,9%).

3.2.8 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση σύστασης

Η τελευταία πειραματική διαδικασία του τρίτου κεφαλαίου αφορούσε την ανάλυση σύστασης των 9 εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Ο κάτωθι πίνακας (Πίνακας 14) παρουσιάζει τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εντοπίστηκαν διάφορες ενώσεις στα εκχυλίσματα καφέ, προεξεχόντων των χλωρογενικών οξέων και των παραγώγων τους.

Πίνακας 14: Το σύνολο των ενώσεων που εντοπίστηκαν στα εκχυλίσματα καφέ

[M-H] ⁻ [M-H] ⁺							
Ενώσεις	t _R (min)	Θεωρητικό m/z	Πειραματικό m/z	Delta (ppm)	RDBeq	Μοριακός τύπος	MS/MS
5-Caffeoylquinic acid (5-CGA or 5CQA)	6,50	353,0867	353,0870	0,379	8,5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191,0835
							178,9312
							135,0009
Caffeoylquinic acid isomer	7,75	353,0858	353,0870	0,929	8,5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191,0743
							134,6538
							262,9866
3-Caffeoylquinic acid (3-CGA or 3-CQA)	8,36	353,0867	353,0863	0,231	8,5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191,0208
							179,0095
4-Caffeoylquinic acid (4-CGA or 4-CQA)	8,56	353,0867	353,0863	0,439	8,5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191,0518
							173,0086
3-p-Coumaroylquinic acid (3-CoQA)	7,91	337,0917	337,0919	0,126	8,5	C ₁₇ H ₁₇ O ₈	163,0369
							190,8751
							118,9217
5-p-Coumaroylquinic acid (5-CoQA)	9,81	337,0917	337,0917	0,124	8,5	C ₁₇ H ₁₇ O ₈	163,5239
							190,3598
							118,5912
3-Feruloylquinic acid (3-FQA)	8,67	367,1026	367,1024	0,001	8,5	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	193,1396
4-Feruloylquinic acid (4-FQA)	9,30	367,1022	367,1024	0,061	8,5	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	193,0504
Feruloylquinic acid isomer	9,90	367,1013	367,1024	1,090	8,5	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	191,1635
5-Feruloquinic acid (5-FQA)	10,49	367,1024	367,1024	0,211	8,5	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	193,0502
Caffeoylquinic acid lactone1	10,46	335,0761	335,0759	0,214	9,5	C ₁₆ H ₁₅ O ₈	179,0514
							161,0862
							135,0232
Caffeoylquinic acid lactone2	10,60	335,0761	335,0760	0,154	9,5	C ₁₆ H ₁₅ O ₈	179,0420
							135,0527
							161,0244
Caffeoylquinic acid lactone 3	10,79	335,0761	335,0764	0,246	9,5	C ₁₆ H ₁₅ O ₈	135,0169
							160,9512
							178,9852
Caffeoylquinic acid lactone 4	10,94	335,0761	335,0763	0,176	9,5	C ₁₆ H ₁₅ O ₈	179,0881
							161,0383
							134,9956
Carboxyatractyloside II	11,05	525,2330	525,2316	4,7	8,5	C ₂₆ H ₃₇ O ₁₁	481,2419
Caffeoylquinic acid isomer	11,11	352,0789	352,0775	1,403	9,0	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	191,1228
3,4-di-O-feruloyl-5-O- caffeoylquinic acid	11,11	705,1603	706,1623	2,023	25,0	C ₃₆ H ₃₃ O ₁₅	513,2287
Feruloylquinic acid lactone 1	12,93	349,0918	349,0917	0,036	9,5	C ₁₇ H ₁₇ O ₈	175,0328
							193,0943
Feruloylquinic acid lactone 2	14,16	349,0918	349,0920	0,084	9,5	C ₁₇ H ₁₇ O ₈	174,9975

							193,0756
							643,5804
Atractyloside I	10,81	727,3594	727,3517	7,740	0,5	C ₂₉ H ₅₉ O ₂₀	319,0404
							481,4643
							565,5366
Atractyloside II	7,90	481,2432	481,2443	0,319	17,5	C ₂₅ H ₃₇ O ₉	301,3550
							319,4069
Carboxyatractyloside III	15,25	609,2906	609,2879	2,653	0,5	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₂	565,4656
Carboxyatractyloside I	15,66	771,3571	771,3571	0,010	0,5	C ₃₀ H ₆₀ O ₂₂	335,1267
							463,3851
Atractyloside III_1	17,53	565,3007	565,2996	1,164	8,5	C ₃₀ H ₄₅ O ₁₀	481,4860
							301,5082
							463,4395
Atractyloside III_3	17,71	565,3007	565,2992	1,534	8,5	C ₃₀ H ₄₅ O ₁₀	481,4860
							301,3772
Caffeine	6,21	195,0877	195,0895	0,192	5,5	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂	137,92
1,5-dicaffeoylquinic acid (1,5-diCQA)	12,54	515,1188	515,1167	1,762	14,5	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	353,2199
							335,2577
							173,0377
3,4 dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA)	12,95	515,1188	515,1167	1,882	14,5	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	353,1824
							173,0116
							191,0214
2,4-dicaffeoylquinic acid (2,4-diCQA)	13,41	515,1188	515,1167	1,763	14,5	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	353,1999
							172,9495
							367,2116
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	13,90	529,1341	529,1327	1,423	14,5	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	335,1851
							173,0893
							367,1817
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	14,12	529,1341	529,1317	2,403	14,5	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	335,2141
							173,0281
							172,9929
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	14,88	529,1341	529,1319	2,033	14,5	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	367,2161
							335,2120
Diferuloylquinic acid (traces)	11,93	543,1497	543,1971	7,437	14,5	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	335,2709
Diferuloylquinic acid (traces)	12,35	543,1497	543,1971	7,437	14,5	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	335,2708
Dicaffeoylquinic acid lactone_1	15,95	497,1162	497,1068	1,608	15,5	C ₂₅ H ₂₁ O ₁₁	----
Dicaffeoylquinic acid lactone_1	16,66	497,1162	497,1068	1,588	15,5	C ₂₅ H ₂₁ O ₁₁	----

Οι παραπάνω ενώσεις προσδιορίστηκαν και πραγματοποιήθηκε ποιοτική σύγκριση μεταξύ τους για όλα τα εκχυλίσματα, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15):

Ενώσεις	Brazil R7	Brazil R6	Brazil R5	Brazil R4	Brazil Πράσινος	Robusta Καβ.	Robusta Πράσινος	Decaf Καβ.	Decaf Πράσινος
3-Caffeoylquinic acid	+	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++
Caffeoylquinic acid isomer	+++	++	++	+	-	++	-	++	-
5-Caffeoylquinic acid	+	++	++	++	+	++	+	+++	+++
4-Caffeoylquinic acid	++	++	++	++	+	++	+	++	++
3-p-Coumaroylquinic acid	+	+++	+++	+++	++	+	++	++	++
5-p-Coumaroylquinic acid	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
3-Feruloylquinic acid	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	++	+++
4-Feruloylquinic acid	+++	+++	+++	++	-	+++	-	+++	+
Feruloquinic acid isomer	+++	++	++	+	-	++	-	++	-
5-Feruloylquinic acid	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
Caffeoylquinic acid lactone1	+++	+	+	+	-	+	-	+	-
Caffeoylquinic acid lactone2	+++	+++	++	+++	-	++	-	+++	-
Caffeoylquinic acid lactone 3	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-
Caffeoylquinic acid lactone 4	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-
Feruloquinic acid lactone 1	+	+++	+++	++	-	+	-	+++	-
Feruloylquinic acid lactone 2	+++	++	++	+++	-	-	-	++	-
Carboxyatractyloside I	-	-	-	-	++	-	+	+	+
Atractyloside I	+	++	++	++	-	+	-	++	++
Atractyloside II	++	++	++	++	-	+	-	++	++
Carboxyatractyloside II	-	-	-	-	++	-	+	+	+
Carboxyatractyloside III	-	-	-	-	++	-	+	+	+
3,4-di-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid	-	-	-	-	++	-	-	-	-
Atractyloside III_1	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Atractyloside III_3	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Caffeine	++	++	++	++	++	+++	++	-	-
1,5-Dicaffeoylquinic acid	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++
3,4 Dicaffeoylquinic acid	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
2,4-Dicaffeoylquinic acid	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	-	++	++	++	-	+++	+++	-	++
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	-	++	++	++	-	+++	+++	-	++
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	-	++	++	++	-	+++	+++	-	++
Diferuloylquinic acid (traces)	-	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++
Diferuloylquinic acid (traces)	+	+++	+++	++	++	-	-	-	-

Πίνακας 15: Ποιοτική σύγκριση της παρουσίας διάφορων ενώσεων στα εκχυλίσματα καφέ

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι όλα τα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε διάφορα είδη χλωρογενικών οξέων (που είναι η κύρια πολυφαινολική ομάδα στον καφέ). Ωστόσο, εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ πράσινων και καβουρδισμένων εκχυλισμάτων για κάποια είδη χλωρογενικών οξέων, όπως το 4-φερουλοϋλοκινικό το οποίο δεν εντοπίστηκε στα πράσινα εκχυλίσματα, παρά μόνο στα καβουρδισμένα. Ακόμα, παρατηρείται ότι κάποιες ενώσεις δημιουργούνται κατά το ψήσιμο καθώς δεν εμφανίζονται στα εκχυλίσματα πράσινων κόκκων, όπως για παράδειγμα οι λακτόνες των χλωρογενικών οξέων. Επιπρόσθετα, οι παρούσες μόνο στα πράσινα εκχυλίσματα καρβοξυ-ατρακτυλοσίδες (carboxy-Atractyloside) στα καβουρδισμένα διασπώνται και μετατρέπονται σε ατρακτυλοσίδες.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση του περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε καφεΐνη και τα τρία κύρια ισομερή χλωρογενικών οξέων (3-,4-,5-καφεϋλοκινικό οξύ), τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 16):

Πίνακας 16: Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε καφεΐνη και μονοκαφεϋλοκινικά οξέα

Εκχυλίσματα καφέ	Καφεΐνη (mg/g)	Μονοκαφεϋλοκινικά οξέα (mCQAs) (mg/g)	5-CQA (mg/g)	3&4-CQA (mg/g)
Brazil R7	3,57	8,15	4,08	4,07
Brazil R6	3,25	15,05	8,09	6,96
Brazil R5	3,65	18,66	11,22	7,44
Brazil R4	3,97	30,23	16,61	13,62
Brazil πράσινος	1,93	6,57	2,67	3,90
Robusta καβουρδισμένος	8,17	25,58	13,97	11,61
Robusta πράσινος	4,81	16,23	8,76	7,57
Decaf καβουρδισμένος	0,09	17,30	7,72	9,58
Decaf πράσινος	0,08	29,10	14,94	14,16

Όπως αναμενόταν, ο Decaf περιέχει μόνο ίχνη καφεΐνης συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Ακόμα τα δείγματα Robusta περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα καφεΐνης από τα Brazil (που σημειωτέο ανήκουν στο είδος *C. arabica*). Ο χρόνος καβουρδίσματος δεν επηρέασε την περιεκτικότητα σε καφεΐνη στην ποικιλία Brazil, ωστόσο παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη μείωση στα επίπεδα των 3 ισομερών χλωρογενικών οξέων. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωρογενικά οξέα εντοπίστηκε στον ελαφρά καβουρδισμένο αν και ο πράσινος Decaf και ο καβουρδισμένος Robusta είχαν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις.

3.2.9 Συσχετίσεις μεταξύ των δοκιμασιών

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση για όλες τις δοκιμασίες που αφορούσαν την χορήγηση καφέ στις κυτταρικές σειρές (GSH, ROS, CARB, TBARS) με το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε CQAs αναλόγως της συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον κάτωθι πίνακα:

Πίνακας 17: Συσχέτιση μεταξύ των βιο-δεικτών στα κύτταρα

C2C12	CQA	GSH	ROS	CARB
GSH	0,333*			
ROS	-	-		
CARB	-	-0,586**	-	
TBARS	-	-	0,382*	0,369*
EA.hy926	CQA	GSH	ROS	CARB
GSH	-			
ROS	-	-		
CARB	-	-	-	
TBARS	-	-	-	-
Συνολικά	CQA	GSH	ROS	CARB
GSH	0,43**			
ROS	-	-		
CARB	-0,29*	-0,313**	-	
TBARS	-	-	0,276*	0,363**

*: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,05$

** : Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,01$

Στους μυοβλάστες παρατηρήθηκε χαμηλή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Ακόμα, χαμηλές θετικές συσχετίσεις καταγράφηκαν μεταξύ CQAs και GSH καθώς και μεταξύ των ROS και των TBARS και CARB.

Όσον αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Στο σύνολο των δύο κυτταρικών σειρών πάντως, φάνηκε ότι τα CQAs συσχετίστηκαν θετικά με την GSH και αρνητικά με τα CARB. Τα τελευταία είχαν αρνητική συσχέτιση και με την GSH, ενώ τέλος τα TBARS είχαν θετική συσχέτιση τόσο με τις ROS όσο και με τα CARB. Ωστόσο, όλες οι παρατηρούμενες συσχετίσεις δεν ήταν ιδιαίτερα ισχυρές.

Ακόμα, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ των υπόλοιπων δοκιμασιών (εξουδετέρωση ριζών σουπεροξειδίου και υδροξυλίου, τεστ του Ames, πολυφαινολικού περιεχομένου και αναστολής δραστηριότητας καταλάσης και οξειδάσης της ξανθίνης) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 18:

Πίνακας 18: Συσχέτιση μεταξύ του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC), του τεστ του Ames (IC₅₀) και της εξουδετέρωσης των ριζών (ειδική ενεργότητα)

	TPC	O ₂ ^{·-}	HO [·]	Τεστ του Ames	Αναστολή CAT
O ₂ ^{·-}	0,783*	-	-	-0,800**	-
HO [·]	-	-	-	-	-
Τεστ του Ames	-0,767*	-0,800**	-	-	-
Αναστολή CAT	-	-	-	-	-
Αναστολή XO	-	0,667*	-	-0,800**	-

*: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,05$

** : Στατιστικά σημαντική συσχέτιση, $p < 0,01$

Με βάση τα αποτελέσματα, το πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) είχε υψηλή θετική συσχέτιση με την ικανότητα αναστολής του σουπεροξειδίου καθώς και την αντιμεταλλαξιγόνο δράση (Ames test) των εκχυλισμάτων καφέ. Για το τεστ του Ames αξίζει να αναφερθεί ότι η συσχέτιση αφορά τις τιμές IC₅₀, άρα π.χ. η αρνητική συσχέτιση με το πολυφαινολικό περιεχόμενο αντικατοπτρίζει μεγαλύτερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση όσο αυξάνονται οι πολυφαινόλες (καθώς μειώνεται η τιμή IC₅₀). Η αναστολή της ρίζας σουπεροξειδίου συσχετίστηκε (εκτός του πολυφαινολικού περιεχομένου) ισχυρά και με το τεστ του Ames καθώς και την ικανότητα αναστολής της XO, ενώ αντίθετα η ικανότητα αναστολής της ρίζας υδροξυλίου δεν συσχετίστηκε με καμία άλλη μέθοδο. Ακόμα, συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης και της ικανότητας αναστολής της XO. Τέλος, η ικανότητα αναστολής της καταλάσης δε συσχετίστηκε με καμία μέθοδο.

3.3 Συζήτηση

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν τα αρχικά πειράματα για τη διαλογή των ποικιλιών που θα εξετάζονταν στο δεύτερο μέρος. Σύμφωνα με τα πρώτα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα κόκκων καφέ επέδειξαν αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και προστατευτική ικανότητα στο DNA, οι οποίες όμως ποίκιλαν αναλόγως της προέλευσης και του είδους του καφέ καθώς και του βαθμού καβουρδίσματος. Εν τέλει επιλέχθηκαν τρεις ποικιλίες:

1. Η Brazil για την οποία υπήρχαν 4 διαφορετικοί χρόνοι καβουρδίσματος και από την οποία το ελαφρά καβουρδισμένο δείγμα ήταν το ισχυρότερο στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων δοκιμασιών.
2. Η Robusta που προέρχεται από διαφορετικό είδος καφέ σε σχέση με τις άλλες δυο
3. Το ντεκαφεϊνέ χαρμάνι, ώστε να μελετηθεί και η επίδραση της έλλειψης καφεΐνης στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καφέ.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, τα επιλεγμένα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε δύο κυτταρικές σειρές για να εξεταστεί η επίδρασή τους (σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις) στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής (για τα επίπεδα GSH και ROS) και φασματοφωτομετρίας (για την οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών). Εξετάστηκε, επίσης, η επίδραση που είχαν τα ισχυρότερα εκχυλίσματα στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων, αφού προηγήθηκε ένα πείραμα με τη χρήση μικροσυστοιχιών που έδειξε πως επηρεάζονται συναφή γονίδια. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μυοβλάστες (C2C12) επιλέχθηκαν καθώς κατά τη διάρκεια της άσκησης (και ειδικότερα των έντονων συνεδριών άσκησης με αντιστάσεις) υπερπαράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου στους μύες καθιστώντας τους ευάλωτους στην οξείδωση μακρομορίων (177–179). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν το εσωτερικό τμήμα των αγγείων και είναι επιρρεπή σε οξειδωτικές βλάβες από τις τοπικά παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οι οποίες σχετίζονται και με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (180,181). Εν συνεχεία, εκτιμήθηκε η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ έναντι του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH με το τεστ του Ames ενώ, τέλος, προσδιορίστηκαν οι ικανότητες αναστολής των ριζών σουπεροξειδίου και υδροξυλίου καθώς και αναστολής δραστηριότητας των ενζύμων καταλάση και οξειδάση της ξανθίνης.

Το σύνολο αυτών των πειραμάτων αποσκοπούσε στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ο καφές μπορεί να ασκήσει ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις και ειδικά σε ό,τι έχει να κάνει με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

3.3.1 Κυτταροτοξικότητα εκχυλισμάτων καφέ

Η χορήγηση όλων των εκχυλισμάτων καφέ είχε ευεργετική επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων όπως αποδείχτηκε, ωστόσο το πρώτο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων ώστε να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις στις επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση από το ΧΤΤ ήταν πως οι μυοβλάστες ήταν πιο ευαίσθητοι στα εκχυλίσματα πράσινων καφέδων συγκριτικά με τα αντίστοιχα καβουρδισμένα, καθώς και στις τρεις ποικιλίες τα πράσινα ήταν τοξικά σε μικρότερη συγκέντρωση. Ειδικά στην ποικιλία Brazil η διαφορά του πράσινου δείγματος με τα καβουρδισμένα ήταν μεγάλη καθώς από τα 20 $\mu\text{g/ml}$ του πράσινου, τα καβουρδισμένα οδήγησαν σε τοξικότητα στα 1600 (80 φορές λιγότερο τοξικό), 400 (20 φορές), 800 (40 φορές) και 400 (20 φορές) $\mu\text{g/ml}$ για τα R4, R5, R6, R7, αντίστοιχα. Στις άλλες δύο ποικιλίες η διαφορά τοξικότητας μεταξύ πράσινου και καβουρδισμένου εκχυλίσματος ήταν 8 φορές για τη Robusta (200 έναντι 1600 $\mu\text{g/ml}$) και 4 φορές για την Decaf (400 έναντι 1600 $\mu\text{g/ml}$). Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι δύο καβουρδισμένα εκχυλίσματα προκάλεσαν αύξηση της βιωσιμότητας των μυοβλαστών σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έλαβαν εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα, το Brazil R4 και το Robusta στα 100, 200, 400 και 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Αυτή η παρατήρηση έγινε μόνο στους μυοβλάστες και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Από την άλλη, στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα καβουρδισμένα εκχυλίσματα ήταν πιο τοξικά σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα για τους καφέδες του είδους *C. arabica* (Brazil και Decaf) ενώ όπως και στους μυοβλάστες, το πράσινο ήταν πιο τοξικό στην ποικιλία Robusta (αν και με σημαντικά μειωμένη διαφορά μεταξύ τους). Αξίζει να σημειωθεί πως τόσο στους μυοβλάστες όσο και στα ενδοθηλιακά, τα πράσινα εκχυλίσματα των Robusta και Decaf εμφάνισαν τοξική επίδραση στην ίδια συγκέντρωση (200 και 400 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα), ωστόσο το πράσινο Brazil ήταν τοξικό σε 20 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών πιθανώς να οφείλονται στην διαφορετική ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν, να απορροφούν και να μεταβολίζουν ξеноβιοτικές ουσίες, όπως είναι αυτές που περιέχονται στον καφέ.

Στη συνέχεια, οι 4 μεγαλύτερες μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του κάθε εκχυλίσματος χορηγήθηκαν και στις δυο κυτταρικές σειρές και αποτιμήθηκε η επίδρασή τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση.

3.3.2 Επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών

Πιο συγκεκριμένα και όσον αφορά την GSH, στους μυοβλάστες παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της από όλα τα εκχυλίσματα που κυμαινόταν από 33-70%. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια, επομένως αύξηση στα επίπεδα της μεταφράζεται και σε ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου (182). Μια σημαντική παρατήρηση σχεδόν σε όλα τα εκχυλίσματα (8 από τα 9, μόνη εξαίρεση ο καβουρδισμένος Decaf) ήταν η δοσοεξαρτώμενη αύξηση της GSH μέχρι μιας μέγιστης τιμής και εν συνεχεία η πτώση της σε μεγαλύτερη/ες συγκέντρωση/εις. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από τον μηχανισμό δράσης των πολυφαινόλων που στηρίζεται στη συγκέντρωσή τους, ακολουθώντας το φαινόμενο της όρμησης (127). Πιο συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει μία ουδό (που διαφέρει ανάλογα με την πολυφαινολική ένωση) τότε δρουν προοξειδωτικά (183–187). Κατ' αυτό τον τρόπο φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες δρουν μέσω του φαινομένου της όρμησης, το οποίο ισχύει για πληθώρα ερεθισμάτων που υφίσταται ένας οργανισμός (127,179). Το γεγονός ότι η πτώση των επιπέδων της GSH (σε σχέση με τη μέγιστη τιμή της) επήλθε στις μέγιστες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων (πάνω από τις οποίες τα εκχυλίσματα παρουσίαζαν κυτταροτοξική δράση) ενισχύει την παραπάνω υπόθεση, καθώς είναι πιθανό η συγκέντρωση των πολυφαινόλων (και των υπόλοιπων συστατικών του καφέ) να ήταν τόσο υψηλή που οι προοξειδωτικές τους ιδιότητες τις κατέστησε τοξικές για τα κύτταρα. Κάτι τέτοιο ενδεχομένως θα μπορούσε να παρατηρηθεί και στην περίπτωση του καβουρδισμένου Decaf αν εξεταζόταν ένα εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ της μέγιστης μη κυτταροτοξικής και της ελάχιστης τοξικής. Παρ' όλα αυτά, στο χαρμάνι Decaf, η απουσία καφεΐνης δεν φάνηκε να επηρεάζει την ικανότητα του καφέ να αυξάνει τα επίπεδα της GSH.

Η παρατηρούμενη αύξηση της γλουταθειόνης μπορεί να εξηγηθεί από διάφορους μηχανισμούς. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα αυξημένα επίπεδα βιοσύνθεσής της (κάτι που προϋποθέτει την επαγωγή έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων), ο ταχύτερος ρυθμός αναγωγής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (προϋποθέτει είτε αυξημένη δραστηριότητα της αναγωγάσης είτε μειωμένη δραστηριότητα της περοξειδάσης της γλουταθειόνης) καθώς και «αντικατάσταση» της

γλουταθειόνης από τα αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ (με αποτέλεσμα τα τελευταία να εξουδετερώνουν τυχόν ελεύθερες ρίζες, χωρίς να οξειδώνεται η γλουταθειόνη). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, η χορήγηση καφέ αυξάνει τα επίπεδα της GSH. Πιο συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (HepG2) η χορήγηση καφεστόλης και καφεόλης, των δύο κύριων διτερπενίων του καφέ, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της GSH λόγω αυξημένων επιπέδων της γ -γλουταμυλοκυστεϊνικής λιγάνης (188). Το ίδιο παρατηρήθηκε σε αρκετούς ιστούς επίμυων έπειτα από χορήγηση των δύο διτερπενίων (189). Επιπρόσθετα, η χορήγηση του κλάσματος υψηλού μοριακού βάρους του καφέ έπειτα από καθαρισμό (το κλάσμα που θεωρητικά περιέχει μελανοϊδίνες), οδήγησε σε αύξηση επιπέδων της GSH σε κύτταρα HepG2 καθώς και προστασία από τις οξειδωτικές επιπτώσεις της ταυτόχρονης χορήγησης του *t*-BOOH (190).

Από αριθμητικής άποψης, η μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα της GSH παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα του ελαφρά καβουρδισμένου Brazil R4, ωστόσο αναλογικά με τη συγκέντρωση καφέ που απαιτήθηκε, το πλέον ισχυρό εκχύλισμα ήταν το πράσινο Brazil που οδήγησε σε αύξηση κατά 65,9% στα 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (160 φορές μικρότερη συγκέντρωση από την αντίστοιχη του R4).

Συνολικά, τα εκχυλίσματα καφέ ενίσχυσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των μυοβλαστών αυξάνοντας σε μεγάλο ποσοστό ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια των κυττάρων, επομένως, η κατανάλωση καφέ μπορεί να θεωρηθεί ως μια πηγή αντιοξειδωτικών μορίων. Η αύξηση της GSH μάλιστα συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά και με την περιεκτικότητα σε μονοκαφευλοκινικά οξέα (mCGAs), τα τρία κύρια ισομερή χλωρογενικών οξέων όπως αυτά αποτιμήθηκαν με τη βοήθεια χρωματογραφίας. Η συσχέτιση αυτή ενδεχομένως να ήταν υψηλότερη αν οι πολυφαινόλες δεν παρουσίαζαν προοξειδωτικό τρόπο δράσης σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα ROS στους μυοβλάστες έπειτα από τη χορήγηση των εκχυλισμάτων. Σε αντίθεση με την GSH, τα εκχυλίσματα καφέ δεν είχαν τόσο έντονη επίδραση στα επίπεδα των ROS, καθώς 4 από τα 9 δεν τα επηρέασαν καθόλου, ενώ στα υπόλοιπα 5 η μέγιστη μείωση έφτασε το 17,6%. Η πιο σημαντική παρατήρηση σχετίζεται με το γεγονός ότι τα καβουρδισμένα εκχυλίσματα επέδειξαν τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ROS συγκριτικά με τα πράσινα ενώ στην ποικιλία Brazil με τους 4 χρόνους καβουρδίσματος φάνηκε να υπάρχει χρονοεξαρτώμενη αύξηση αυτής της ικανότητας. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο παρόν πείραμα εκτιμήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα ελευθέρων ριζών, χωρίς την χορήγηση κάποιου

οξειδωτικού παράγοντα και σύμφωνα και με όσα αναφέρθηκαν στη θεωρία, η διατήρηση της ομοιόστασης ως προς την οξειδοαναγωγική κατάσταση προϋποθέτει μια ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων.

Συγκριτικά πάντως με τη δραστικότητα των εκχυλισμάτων στο προηγούμενο κεφάλαιο είναι εμφανής μία διαφοροποίηση, καθώς στα προηγούμενα πειράματα το ελαφρύ καβούρδισμα εμφάνισε τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών συγκριτικά με τα πιο έντονα ενώ στους μυοβλάστες φάνηκε το ακριβώς αντίθετο. Η ικανότητα του καφέ να μειώσει τις ROS έχει αναφερθεί σε μία εντερική κυτταρική σειρά, Caco-2, όπου η χορήγηση καφέ οδήγησε σε μείωση των παραγόμενων ROS έπειτα από ταυτόχρονη χορήγηση H₂O₂, το οποίο δρα οξειδωτικά (191).

Εκτός της εκτίμησης των επιπέδων GSH και ROS, μετρήθηκαν και τα επίπεδα οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων φασματοφωτομετρικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η οξείδωση πρωτεϊνών μειώθηκε με το καβούρδισμα και στις τρεις ποικιλίες και μάλιστα αναλογικά με το χρόνο (ποικιλία Brazil). Στην ποικιλία Brazil το ίδιο παρατηρήθηκε και για την υπεροξείδωση λιπιδίων καθώς ενώ ο πράσινος καφές δεν προσφέρει κάποια προστασία, το εκχύλισμα του R7 (του πιο καβουρδισμένου εκχυλίσματος) μειώνει την οξείδωση έως και 37% (ίδιο ποσοστό παρατηρήθηκε και για την πρωτεϊνική οξείδωση από το συγκεκριμένο εκχύλισμα). Αυτές οι παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των ROS, καθώς εκεί φάνηκε πως η παράταση του χρόνου καβουρδίσματος οδήγησε σε αυξημένη ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών. Επομένως μια λογική εξήγηση θα ήταν πως η ικανότητα των ενώσεων που περιέχονται στον καφέ (προεξεχόντων των γλωρογενικών οξέων) να αποτοξικοποιούν τα κύτταρα από τις ROS σχετίζεται με την ικανότητα προστασίας των μακρομορίων από οξείδωση. Πράγματι, αυτό επιβεβαιώθηκε εν μέρει και από την ανάλυση συσχέτισης, καθώς εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (έστω και χαμηλές) μεταξύ της εξουδετέρωσης των ROS και της μείωσης των TBARS (λιπιδική οξείδωση), καθώς και μεταξύ λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξείδωσης.

Βέβαια, η απευθείας εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών μπορεί να εξηγήσει μόνο εν μέρει την προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων. Ένας άλλος μηχανισμός που θα μπορούσε να συνεισφέρει στις ανωτέρω παρατηρήσεις είναι η επαγωγή των ενδογενών μηχανισμών αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων.

Αξιοσημείωτο είναι πως στην ποικιλία Robusta, το καβουρδισμένο δείγμα οδηγεί σε πτώση των καρβονυλίων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου κατά 51,5% (η μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε) ενώ από την άλλη το εκχύλισμα Brazil R5 δεν είχε κάποια επίδραση σε καμία από

τις δυο δοκιμασίες. Το καβούρδισμα δεν φάνηκε να έχει επίπτωση στην προστατευτική ικανότητα της ποικιλίας Decaf όσον αφορά τη λιπιδική υπεροξειδωση καθώς τόσο το πράσινο όσο και το ψημένο εκχύλισμα είχαν παρεμφερή δραστηριότητα. Αντιθέτως στην ποικιλία Robusta το ψήσιμο είχε αρνητική επίδραση ως προς τα TBARS καθώς το καβουρδισμένο δείγμα επέδειξε χαμηλότερη προστατευτική ικανότητα.

Όλα τα προαναφερθέντα δεδομένα καθιστούν παραπάνω από εμφανή την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των βιοδραστικών ενώσεων του καφέ με τα κύτταρα, καθώς συγκριτικά με τις δοκιμασίες του πρώτου πειραματικού μέρους, η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων επηρεάζεται τόσο από την απορρόφηση των συστατικών από τα κύτταρα όσο και από το μεταβολισμό τους από τα ενδογενή συστήματα.

Συνολικά, όλα τα εκχυλίσματα καφέ είχαν θετική επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυοβλαστών κάτι που μεταφράστηκε κυρίως σε αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης και σε μικρότερο βαθμό σε μείωση των επιπέδων των ROS, καθώς και προστασία έναντι των οξειδώσεων των πρωτεϊνών και των λιπιδίων.

Η προστατευτική δράση των μορίων του καφέ έναντι της μακρομοριακής οξειδωσης έχει αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία και μάλιστα έπειτα από κατανάλωση από ανθρώπους, καθώς βρέθηκε πτώση των επιπέδων καρβονυλίωσης στο πλάσμα (192). Επιπρόσθετα, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται να προστεθούν σε μια σειρά μελετών του εργαστηρίου μας που φανερώνουν την ευεργετική επίδραση που έχουν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα (σταφυλιού, ψυχανθών και ελαιόλαδου) στην οξειδοαναγωγική κατάσταση κυττάρων (161,162,193,194). Ο συνδυασμός αυτών των εργασιών φανερώνει πόσο σημαντική μπορεί να είναι η διατροφή για την παροχή βιοδραστικών ενώσεων με ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις. Ωστόσο, η απορρόφηση τέτοιων βιοδραστικών ουσιών παραμένει ένα μεγάλο προς επίλυση θέμα, ειδικά όσον αφορά τις πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα για τον καφέ, τα χλωρογενικά οξέα (στα παρόντα εκχυλίσματα τα τρία κύρια CGAs έφταναν και 30 mg/g καφέ) παρουσιάζουν απορρόφηση από τον οργανισμό που φτάνει το 30% με βάση μετρήσεις της βιβλιογραφίας (21,195). Έχοντας ως κανόνα το ανωτέρω ποσοστό, μπορεί να υπολογιστεί η αναλογία των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων στα πειράματα των κυτταρικών σειρών σε κούπες καφέ. Κατά μέσο όρο, μία κούπα καφέ περιέχει ~200 mg χλωρογενικών οξέων με μοριακό βάρος 354 g/mol (ποικίλλει σημαντικά αναλόγως του είδους, της επεξεργασίας κα) (144). Ο μέσος άνθρωπος ζυγίζει 70 Kg και περιέχει 42 l νερού στα οποία μπορούν να κατανεμηθούν τα CGAs. Με βάση αυτά τα νούμερα, από την εξίσωση

υπολογισμού της συγκέντρωσης, $C = \frac{n}{V}$ (mol/l), προκύπτει ότι 4,04 nmol/ml CGAs στο πλάσμα μπορούν να επιτευχθούν με την κατανάλωση μιας κούπας καφέ, χωρίς όμως να λαμβάνονται υπόψη τυχόν μεταβολισμός ή αλληλεπίδραση με άλλα μόρια (πχ αλβουμίνη). Η συγκέντρωση καφέ των 100 μg/ml στην παρούσα εργασία με περιεκτικότητα σε CGAs 30 μg/g (όπως στην περίπτωση του Brazil R4) οδηγεί σε ~8,37 nmol/ml αντιστοιχώντας περίπου σε 2 κούπες καφέ. Έτσι, οι συγκεντρώσεις των 50-200 μg/ml που χρησιμοποιήθηκαν -μεταξύ άλλων- είναι βιολογικά σημαντικές, αντιστοιχώντας σε κατανάλωση 1-4 κουπών καφέ.

3.3.3 Επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων

Όπως και στους μυοβλάστες, η κύρια επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ στα κύτταρα EA.hy926 αφορούσε την αύξηση των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης. Ωστόσο, αυτό δεν παρατηρήθηκε σε τόσο μεγάλη έκταση καθώς η μέγιστη αύξηση έφτασε το 32,7 % (συγκριτικά με το 70% στην προηγούμενη κυτταρική σειρά) για το εκχύλισμα καβουρδισμένου Robusta. Η μικρότερη επίδραση ήταν έκδηλη και από το γεγονός ότι δεν επέδρασαν όλα τα εκχυλίσματα, με το Brazil R6 να μην παρουσιάζει κάποια αύξηση στην GSH. Μάλιστα, η ικανότητα του καφέ να αυξάνει την GSH φάνηκε να επηρεάζεται από τον χρόνο καβουρδίσματος, καθώς στην ποικιλία Brazil τη μεγαλύτερη επίδραση την είχαν το πράσινο και το ελαφρά (R4) καβουρδισμένο δείγμα. Μία ομοιότητα μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών σχετικά με την ποικιλία Brazil αφορά τη ισχυρότερη επίδραση των εκχυλισμάτων R4 και R7 σε σχέση με τα R5 και R6. Στις άλλες δύο ποικιλίες το καβούρδισμα δεν επηρέασε ιδιαίτερα τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων, καθώς τόσο τα πράσινα όσο και τα καβουρδισμένα δείγματα οδήγησαν στα ίδια επίπεδα αύξησης της GSH. Επιπρόσθετα, η απουσία καφεΐνης στο χαρμάνι Decaf δεν επηρέασε την ικανότητα του καφέ να επιδρά στα επίπεδα γλουταθειόνης.

Αναλογικά με τη συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος πάντως φαίνεται να αντιστρέφεται η δραστηριότητα συγκριτικά με τους μυοβλάστες, καθώς τα καβουρδισμένα εκχυλίσματα (που ήταν και πιο τοξικά στα ενδοθηλιακά) οδήγησαν σε αύξηση της GSH σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα.

Μια σημαντική παρατήρηση είναι πως, όπως και στους μυοβλάστες, η μέγιστη αύξηση της GSH παρατηρήθηκε όχι στην μέγιστη συγκέντρωση του καφέ, αλλά σε ενδιάμεσες, με την περαιτέρω αύξηση συγκέντρωσης να οδηγεί σε πτώση των επιπέδων της GSH, κάτι που όπως

προαναφέρθηκε πιθανότατα σχετίζεται με τον πολύπλοκο τρόπο δράσης των περιεχόμενων συστατικών και δη των πολυφαινολών του καφέ.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της ανηγμένης γλουταθειόνης, στις ROS παρατηρήθηκε ισχυρότερη επίδραση των εκχυλισμάτων καφέ στα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκριτικά με τους μυοβλάστες. Καταρχάς, μόλις σε ένα δείγμα δεν επηρεάστηκαν οι ROS (το πράσινο Brazil) ενώ στα υπόλοιπα μειώθηκαν με το μεγαλύτερο ποσοστό να σημειώνεται στο πιο καβουρδισμένο εκχύλισμα Brazil (R7) με 32,3% στα 50 μg/ml. Είναι ενδιαφέρον ότι και οι δυο κυτταρικές σειρές είχαν κοινό γνώμονα την αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών χρονοεξαρτώμενα με το καβούρδισμα στην ποικιλία Brazil, καθώς το πιο καβουρδισμένο δείγματα ήταν και στις δυο το ισχυρότερο ως προς αυτό το γνώρισμα. Στις άλλες δυο ποικιλίες διαπιστώθηκαν αντικρουόμενα αποτελέσματα πάντως, καθώς στη μεν Robusta το καβούρδισμα αύξησε την ικανότητα εξουδετέρωσης των ROS σε σχέση με το πράσινο εκχύλισμα, ενώ στο Decaf ίσχυσε το αντίθετο, με το καβούρδισμα να μειώνει την ικανότητα αυτή.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορούσε τη σχέση συγκέντρωσης-δραστικότητας, καθώς όπως και στην περίπτωση της GSH, η μείωση των ROS (όπου αυτή παρατηρήθηκε) δεν ήταν δόσοεξαρτώμενη. Όπως ακριβώς και στην περίπτωση της GSH, η μεγαλύτερη δραστικότητα παρατηρήθηκε σε υπομέγιστες συγκεντρώσεις, ενώ σε μεγαλύτερες τα επίπεδα των ROS αυξήθηκαν. Αυτό το φαινόμενο κατά πάσα πιθανότητα σχετίζεται με τον αντιοξειδωτικό/προοξειδωτικό τρόπο δράσης των πολυφαινολών.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα των CARB και TBARS, τα εκχυλίσματα καφέ παρουσίασαν προστατευτική επίδραση σε κάποιες περιπτώσεις αλλά συγκριτικά με τους μυοβλάστες ήταν λιγότερο δραστικά. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι μόλις 4 και 5 εκχυλίσματα εμφάνισαν προστατευτική δράση έναντι της πρωτεϊνικής και της λιπιδικής οξειδωσης αντίστοιχα, συγκριτικά με τα 8 και στις δυο περιπτώσεις στους μυοβλάστες.

Στην ποικιλία Brazil το ελαφρύ καβούρδισμα ενίσχυσε την προστατευτική ικανότητα του καφέ συγκριτικά με το αντίστοιχο πράσινο εκχύλισμα και στις δύο δοκιμασίες (έως και 22% μείωση), ωστόσο η επέκταση του χρόνου καβουρδίσματος εξαφάνισε τη δραστικότητα του, επαναφέροντας τα επίπεδα οξειδωσης στα ίδια με τα κύτταρα ελέγχου. Κατ' αυτό τον τρόπο παρατηρείται μια συμφωνία με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου όπου το ελαφρύ καβούρδισμα επέδειξε τη μεγαλύτερη δραστικότητα. Στις υπόλοιπες δύο ποικιλίες, στη μεν Robusta βρέθηκε αύξηση της προστασίας πρωτεϊνών με το καβούρδισμα, ενώ όσον αφορά τη

λιπιδική υπεροξειδωση δεν υπήρξε επίδραση του καφέ (ούτε ως πράσινο ούτε ως καβουρδισμένο εκχύλισμα). Στη δε Decaf φάνηκε πως το καβούρδισμα μείωσε την προστατευτική ικανότητα του πράσινου εκχυλίσματος και στις δυο δοκιμασίες. Προστατευτική επίδραση του καφέ έναντι της οξειδωσης μακρομορίων έχει αποδειχθεί και *in vivo* χωρίς όμως να έχει διερευνηθεί η πιθανότητα ιστο-εξειδίκευσης (196,197).

Και στην περίπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων άρα είναι εμφανής η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των συστατικών του καφέ με τα κύτταρα αναλόγως του είδους και του καβουρδίσματος. Στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν σημειώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Στο σύνολο όμως και των δύο κυτταρικών σειρών φάνηκε πως υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε χλωρογενικά οξέα και της αύξησης στα επίπεδα GSH, καθώς και αρνητική συσχέτιση τους (τόσο των CGAs όσο και της GSH) με τα επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των TBARS συσχετίστηκαν σημαντικά με τις μεταβολές τόσο των ROS όσο των καρβονυλίων. Η παραπάνω ανάλυση φανερώνει πως ο καφές προσφέρει στα κύτταρα αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία αφενός ενισχύουν τους ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας και αφετέρου οδηγούν σε μείωση των οξειδώσεων στα μακρομόρια.

Γενικά, όπως αναφέρθηκε σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε προστατευτική επίδραση των εκχυλισμάτων, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους μυοβλάστες. Αυτή η διαφορά, όπως και το σύνολο των διαφορών τόσο στην τοξικότητα όσο και στην επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση (ισχυρότερη δράση του καφέ όσον αφορά την GSH στους μυοβλάστες και ασθενέστερη όσον αφορά τα ROS) υποδηλώνει μια πιθανή ιστοειδική επίδραση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Ο συνδυασμός των ανωτέρω αποτελεσμάτων θα μπορούσε να έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις σχετικά με τη διατροφή αθλητών αλλά και ατόμων με καρδιαγγειακά προβλήματα καθώς η κατανάλωση καφέ ενδεχομένως να οδηγεί σε ευεργετικά αποτελέσματα. Άλλωστε ο καφές είναι ήδη ένα εξαιρετικά δημοφιλές ρόφημα και αποτελεί μέρος της καθημερινότητας εκατοντάδων εκατομμυρίων ανθρώπων. Πιο συγκεκριμένα, ο συνδυασμός αυτών των αποτελεσμάτων με αυτά της βιβλιογραφίας προσφέρει δεδομένα σχετικά με τις πιθανές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των συστατικών του καφέ αναλόγως του είδους, του καβουρδίσματος και της δόσης του με απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίηση της κατανάλωσης του ροφήματος.

3.3.4 Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης

Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση τόσο των μυοβλαστών όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων, κίνησε το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου επιτυγχάνονται αυτές.

Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη επίδραση στα επίπεδα GSH (70%), το ελαφρά καβουρδισμένο Brazil (R4), στη συγκέντρωση των 400 μg/ml στους μυοβλάστες. Έπειτα από χορήγησή του στα κύτταρα, απομονώθηκε το mRNA και αναλύθηκε με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών ώστε να φανεί κατά πόσο επέδρασε στην έκφραση των γονιδίων.

Θέτοντας ως ελάχιστο όριο τη διαφορά έκφρασης κατά 50%, προκάλεσε επαγωγή έκφρασης σε 35 γονίδια, μειώνοντας παράλληλα την έκφραση σε μόλις ένα. Τα γονίδια αυτά αναλύθηκαν από το λογισμικό DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (198). Η ανάλυση κατέδειξε πως επηρεάστηκαν κάποια μεταβολικά μονοπάτια και κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των: μεταβολισμός ξενοβιοτικών από το σύστημα κυτοχρώματος P450, η αποτοξικοποίηση χημικών καρκινογόνων και ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης.

Το 42,9% των γονιδίων των οποίων αυξήθηκε η έκφραση (15/35) σχετίζεται είτε με τον μεταβολισμό είτε με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Αναλυτικότερα, τα πέντε κωδικοποιούν για S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, όπως η GSTa2. Πρόκειται για σημαντικά μεταβολικά και αντιοξειδωτικά γονίδια. Συμμετέχουν στη φάση II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών καθώς τους ενσωματώνουν ένα μόριο γλουταθειόνης, καθιστώντας τα πιο υδρόφιλα και επιρρεπή σε απέκκριση (199). Οι GSTs χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τις κυτταροπλασματικές, τις μιτοχondριακές και τις μικροσωμικές. Στην παρούσα μελέτη αυξήθηκε η έκφραση (από 1,68-2,49 φορές) τεσσάρων κυτταροπλασματικών (*gsta1*, *a2*, *a4*, *m1*) και μιας μικροσωμικής (*mgst2*). Επαγωγή των GSTs έπειτα από τη χορήγηση καφέ έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία (200,201).

Ένα σημαντικό γονίδιο του οποίου η έκφραση αυξήθηκε ήταν αυτό που κωδικοποιεί την NAD(P)H οξειδοαναγωγή των κινονών 1 (*nqo1*) κατά 2,02 φορές. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό κυτταροπροστατευτικό ένζυμο που καταλύει πληθώρα αντιδράσεων, κυρίως μέσω της αποτοξικοποίησης κινονών (202). Ανήκει και αυτό στη φάση II του μεταβολισμού ενώ η έκφραση του ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και έχει βρεθεί να αυξάνεται συχνά ως απόκριση της χορήγησης πολυφαινόλων όπως τα χλωρογενικά (203,204).

Δυο ακόμα γονίδια της φάσης II που αυξήθηκαν κωδικοποιούν για δύο γλυκουρονιδοτρανσφεράσες (ugt) και συγκεκριμένα τις UGT1a9 και UGT1a10 κατά 1,68 και 1,63 φορές, αντίστοιχα. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την πρόσδεση μιας γλυκουρονιδομάδας στα υποστρώματά τους κι έτσι καθίστανται πιο υδρόφιλα. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι η χορήγηση καφέ αυξάνει την έκφραση των UGTs (205,206).

Εκτός αυτών, αυξήθηκε (κατά 2,01 φορές) και ένα γονίδιο, που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο του συστήματος P450 (*cyp1b1*), της φάσης I του μεταβολισμού. Πρόκειται για μια μονοξυγενάση που περιέχει αίμη με μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Η έκφραση του ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα AhR (Aryl hydrocarbon receptor), ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση σε ξενοβιοτικά που έχουν τη δομή πολυαρωματικού υδρογονάνθρακα. Προκαλεί ενδιαφέρον και μια πρόσφατη μελέτη κατά την οποία παρατηρήθηκε πως η χορήγηση καφέ οδήγησε σε ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα (207).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την θειορεδοξίνη 1 (*txn1*) αυξήθηκε κατά 1,58 φορές. Αυτό το ένζυμο καταλύει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω των δυο κυστεϊνών του ενεργού του κέντρου, βοηθώντας στη διατήρηση της ομοιόστασης δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες του κυττάρου (208). Η χορήγηση CGA σε επίμυες αυξάνει τα επίπεδα της θειορεδοξίνης (209).

Άλλα μεταβολικά γονίδια που υπερεκφράστηκαν λόγω της χορήγησης καφέ συμπεριλαμβάνουν αυτά που κωδικοποιούν για την αλδεϋδική αφυδρογονάση 3a1 (*aldh3a1*), την εστεράση D (*esd*) και την N-μεθυλοτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου (*nnmt*). Το πρώτο συμμετέχει στη φάση I του μεταβολισμού, ωστόσο παρουσιάζει και σημαντική αντιοξειδωτική δράση αποτοξικοποιώντας τα κύτταρα από την 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE), ένα παραπροϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης (όπως είναι και η μηλονική διαλδεϋδη) που προκαλεί καρβονυλίωση των πρωτεϊνών (210,211). Η εστεράση D (ή υδρολάση της S-φορμυλογλουταθειόνης) είναι μια καρβοξυλοεστεράση που ενέχεται σε αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού (212), ενώ η NNMT είναι ένα ένζυμο που μεταβολίζει ξενοβιοτικά και το οποίο μεθυλιώνει τα υποστρώματα του κάνοντας χρήση της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) ως δότη μεθυλίου (213).

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπερεκφράστηκαν και δύο γονίδια που σχετίζονται με το 26S πρωτεάσωμα και πιο συγκεκριμένα η ρυθμιστική υπομονάδα 12 του πρωτεασώματος (*pmsd12*) καθώς και η υπομονάδα 2 ενεργοποίησης του πρωτεασώματος (*pa28 beta*) κατά 1,68- και 1,54- φορές αντίστοιχα. Το 26S πρωτεάσωμα είναι ένας μηχανισμός στοχευμένης (λόγω της ουβικιτινυλίωσης) αποικοδόμησης πρωτεϊνών που έχουν καταστραφεί (πχ καρβονυλίωση) ή που

είναι πλέον περιττές για το κύτταρο. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 μπορεί να προκαλέσει επαγωγή τέτοιων γονιδίων (214).

Όπως φάνηκε, τα περισσότερα από τα ανωτέρω γονίδια αποτελούν στόχο του Nrf2 (εξαιρέση αποτελούν τα *aldh3a1* και *nnmt*) καθώς περιέχουν τις αλληλουχίες ARE στους υποκινητές τους (215). Επιπλέον κάποια από αυτά τα γονίδια (*ugt1* και *aldh3a1*) περιέχουν επίσης και τις αλληλουχίες Xenobiotic Response Elements (XREs) που σημαίνει πως υπόκεινται σε μεταγραφικό έλεγχο και από τον μεταγραφικό παράγοντα AhR. Οι δυο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες (που είναι ίσως οι πιο σημαντικοί σχετικά με τον μεταβολισμό ξενοβιοτικών) παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση καθώς το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον Nrf2 υπόκειται σε έλεγχο έκφρασης από τον AhR (216). Ανήκουν στις οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων bZIP και bHLH οι οποίες δημιουργούν περίπλοκα αλλά και συντηρημένα δίκτυα ετεροδιμερισμών, όντας ικανοί να «μεταφράσουν» πληθώρα περιβαλλοντικών σημάτων μέσω του συναγωνισμού για κοινά ετεροδιμερή της ίδιας οικογένειας (217). Επιπλέον, οι παράγοντες bZIPs όπως ο Nrf2 περιέχουν συντηρημένες κυστεΐνες στις περιοχές πρόσδεσης του DNA, οι οποίες θα μπορούσαν να καθορίσουν τη σύνδεση αναλόγως της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (218). Τα χλωρογενικά οξέα που περιέχονται στον καφέ έχει αναφερθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 (121).

Καθώς το πείραμα με τη χορήγηση καφέ και την μετέπειτα ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών κατέληξε σε ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις σχετικά με τους οριακούς μηχανισμούς που ενδεχομένως επηρεάζει ο καφές, επιλέχθηκαν 10 γονίδια που διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα (και αποτελούν και στόχους του Nrf2) για να μελετηθεί η επίδραση του καφέ στα επίπεδα τους. Για το σκοπό αυτό έγινε επιλογή των πλέον δραστικών δειγμάτων ως προς την επίδραση στα επίπεδα γλουταθειόνης (η οποία ήταν και ο κύριος δείκτης που επηρεάστηκε στις κυτταρικές σειρές) και πιο συγκεκριμένα το ελαφρά καβουρδισμένο (R4) της ποικιλίας Brazil (το οποίο είχε χορηγηθεί και στις μικροσυστοιχίες) και το αντίστοιχο πράσινο, για λόγους σύγκρισης.

Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε για κάθε εκχύλισμα ήταν αυτή στην οποία παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση της γλουταθειόνης ανά κυτταρική σειρά. Κατα αυτό τον τρόπο, στους μυοβλάστες χορηγήθηκαν 400 $\mu\text{g/ml}$ καβουρδισμένου και 2,5 $\mu\text{g/ml}$ πράσινου, ενώ στα ενδοθηλιακά και 100 $\mu\text{g/ml}$ και από τα δυο εκχυλίσματα. Η χορήγηση αφορούσε τρία διακριτά χρονικά σημεία (3 h, 12 h, 24 h) για να φανεί η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση με το πέρασ του

χρόνου (αξιζει να αναφερθεί πως όλοι οι προηγούμενοι δείκτες αφορούσαν την χορήγηση καφέ για 24 h).

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα γονίδια σχηματίζουν ένα σύνθετο δίκτυο κυτταροπροστατευτικών μηχανισμών κι έτσι τυχόν επίδραση στα επίπεδα έκφρασής τους είναι σημαντικός δείκτης για τη δυνατότητα μιας ένωσης ή ενός μίγματος (όπως τα εκχυλίσματα καφέ στην προκειμένη) να επηρεάσει αυτούς τους μηχανισμούς και εν συνόλω την αντιοξειδωτική άμυνα ενός κυττάρου/οργανισμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης, στους μυοβλάστες το καβουρδισμένο εκχύλισμα προκάλεσε επαγωγή των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλουταθειόνης (*gcl*, *grx1*, *gsta2*) στην πλειονότητα των χρονικών στιγμών που εξετάστηκαν και μάλιστα χρονοεξαρτώμενα, με μόνη εξαίρεση το γονίδιο της αναγωγής της γλουταθειόνης (*gsr*) το οποίο δεν επηρεάστηκε. Η αύξηση της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων μπορεί να δικαιολογήσει και την παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, κυρίως μέσω του αυξημένου ρυθμού βιοσύνθεσης (λόγω υπερέκφρασης του *gclc*). Το *nr01* επίσης υπερεκφράστηκε σημαντικά φτάνοντας τις 5 φορές σε σχέση με τα κύτταρα control, ενώ αντίθετα μειωμένη έκφραση παρατηρήθηκε για το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπεροξειδική δισμουτάση. Στα υπόλοιπα γονίδια δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του καφέ στα επίπεδα έκφρασης. Τα ευρήματα συνηγορούν στο ότι είναι αρκετά πιθανό τα συστατικά του καβουρδισμένου καφέ να ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 απελευθερώνοντάς τον από την Keap1. Για να γίνει αυτό, ωστόσο, απαιτείται να δράσουν ως προοξειδωτικά μόρια, κάτι που προϋποθέτει αρκούντως υψηλή συγκέντρωση. Σύμφωνα με την ανάλυση σύστασης, ο καφές περιέχει σημαντικές ποσότητες του 5-καφεοϋλοκινικού οξέος (5-CQA), το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει τον Nrf2, καθώς οξειδώνει τις κυστεΐνες της Keap1 (οι πολυφαινόλες όταν οξειδώνονται μετατρέπονται σε κινόνες που είναι εν δυνάμει οξειδωτικά μόρια), απελευθερώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα (121,219). Επιπρόσθετα, έει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή H₂O₂ το οποίο οξειδώνει τις κυστεΐνες της Keap1 (220,221). Όσον αφορά τα γονίδια τα οποία δεν επηρεάστηκαν ή μειώθηκαν (*sod1*), μια υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι πως για λόγους κυτταρικής οικονομίας δεν απαιτήθηκε η υπερέκφραση τους, παρ' όλη την ύπαρξη αλληλουχιών AREs στους υποκινητές τους.

Εκ διαμέτρου αντίθετη εικόνα παρουσιάστηκε έπειτα από χορήγηση του εκχυλίσματος πράσινου Brazil. Με βάση την προηγούμενη ενότητα, η συγκέντρωση των 2,5 μg/ml προκάλεσε

αύξηση της GSH κατά 65,9% (σχεδόν ισάξια με το 70% του καβουρδισμένου εκχυλίσματος), άρα θεωρητικά θα αναμενόταν παρεμφερής επίδραση και στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, ειδικά στα γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του τριπεπτιδίου.

Ωστόσο, κανένα γονίδιο δεν υπερεκφράστηκε ως αποτέλεσμα της χορήγησης του εκχυλίσματος πράσινου καφέ. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε υποέκφραση σε 6 από τα 10 εξεταζόμενα γονίδια, ενώ τα υπόλοιπα δεν επηρεάστηκαν σημαντικά αν και παρατηρείται μια τάση πτώσης. Αυτή η διαφορά μεταξύ του καβουρδισμένου και του πράσινου εκχυλίσματος θα μπορούσε να αποδοθεί στον τρόπο δράσης των πολυφαινολών. Η υπόθεση που μπορεί να γίνει αφορά τη συγκέντρωση των δυο εκχυλισμάτων, καθώς το μεν πράσινο χορηγήθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση (160 φορές χαμηλότερη από αυτή του καβουρδισμένου), άρα είναι πιθανό η συγκέντρωση των περιεχόμενων πολυφαινολών να είναι σε τόσο χαμηλό επίπεδο που δρουν ως άμεσα αντιοξειδωτικά, διατηρώντας ανέπαφα τα ενδογενή επίπεδα γλουταθειόνης, κάτι που οδήγησε και σε εφησυχασμό του κυττάρου που για λόγους οικονομίας μείωσε την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Αντιθέτως, το καβουρδισμένο εκχύλισμα χορηγήθηκε σε τέτοια συγκέντρωση που επέτρεψε την εμφάνιση του προοξειδωτικού τρόπου δράσης των πολυφαινολών (χωρίς όμως να φτάνει σε τοξικά επίπεδα), οδηγώντας πιθανότατα στην ενεργοποίηση του Nrf2. Έτσι φάνηκε πως και μεν τα δυο εκχυλίσματα είχαν φαινομενικά παρεμφερή αποτελέσματα στην οξειδοαναγωγική κατάσταση, ωστόσο αυτά επιτεύχθηκαν μέσω διαφορετικού μηχανισμού.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η διαφορά μεταξύ καβουρδισμένου και πράσινου καφέ δεν ήταν τόσο έντονη, καθώς και οι δυο χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια συγκέντρωση (100 μg/ml). Παρ' όλα αυτά και πάλι ο καβουρδισμένος είχε εντονότερη επίδραση, οδηγώντας στην υπερέκφραση 5 γονιδίων ενώ ο πράσινος μόλις σε δυο. Και τα δυο δείγματα προκάλεσαν υποέκφραση δυο γονιδίων.

Ο καβουρδισμένος οδήγησε σε επαγωγή έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη γλουταθειόνη (*gclc*, *gsr*), ενώ ειδικά το δεύτερο αυξήθηκε κατά 14 φορές. Ο συνδυασμός αυτών των δυο με τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (*gpxi*) μπορεί να εξηγήσει τα αυξημένα επίπεδα της GSH της προηγούμενης ενότητας (~20%), τόσο λόγω αυξημένης βιοσύνθεσης, όσο και λόγω αυξημένου ρυθμού ανακύκλωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν κατέστη δυνατό να αναλυθεί η έκφραση της μεταφοράς της γλουταθειόνης. Εκτός αυτών, αυξήθηκαν επίσης τα επίπεδα του *sod1* και του *txn*, καθώς και του *nqo1*.

Το εκχύλισμα πράσινου καφέ δεν είχε τόσο αρνητική επίπτωση στην έκφραση γονιδίων όπως στους μυοβλάστες, κάτι που λογικά οφείλεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που χορηγήθηκε. Προκάλεσε υπερέκφραση της *gpx1* και του *nrf2* τα οποία παρεμπιπτόντως ήταν τα μόνα δυο που υποεκφράστηκαν στα συγκεκριμένα κύτταρα από το καβουρδισμένο εκχύλισμα. Παράλληλα, οδήγησε σε υποέκφραση των *txn* και *gclc*, δυο από τα 5 που αύξησε το καβουρδισμένο.

Συνολικά, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην επίδραση των δυο εκχυλισμάτων στη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα, καθώς το καβουρδισμένο εκχύλισμα ήταν πιο ισχυρό, όπως και στην περίπτωση των μυοβλαστών.

Η επαγωγή έκφρασης τέτοιων γονιδίων έρχεται σε συμφωνία και με δεδομένα της βιβλιογραφίας έπειτα από χορήγηση καφέ σε κύτταρα ή ανθρώπους (121,196,201,219,222). Πιο συγκεκριμένα, χορηγήθηκε καφές σε 18 υγιείς εθελοντές (ενώ άλλοι τόσοι αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου) και μέσω Real-time PCR εντοπίστηκε τάση για αύξηση έκφρασης των *nqo-1*, *sod1*, *gsta2*, *nrf2* κ.ά. Οι παρατηρούμενες αυξήσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, πιθανόν λόγω της επίδρασης άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων ή λόγω φαινοτυπικής ποικιλομορφίας, ωστόσο παρατηρείται μία τάση προς ένα πρότυπο έκφρασης της συγκεκριμένης κατηγορίας γονιδίων (196). Μια μελέτη σε κύτταρα HT29 κατέδειξε σημαντική αύξηση γονιδίων που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς όπως τα *ho-1*, *nrf2* και *γ-gcl* έπειτα από χορήγηση εκχυλισμάτων καφέ (121).

Σε κάθε περίπτωση, τα ανωτέρω αποτελέσματα αφορούν τα επίπεδα μεταγραφής γονιδίων, αλλά είναι γνωστό πως μεταβολές στα επίπεδα των mRNA δεν οδηγούν αυτόματα και σε μεταβολή στα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών, καθώς η γονιδιακή έκφραση υπόκειται πολλαπλά στάδια ρύθμισης (πχ RNAi) και ελέγχου με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Κατ' αυτό τον τρόπο, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει μέσω ανάλυσης των επιπέδων των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Εν κατακλείδι, η χορήγηση εκχυλίσματος καβουρδισμένου καφέ επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με κυτταροπροστατευτικούς μηχανισμούς, γεγονός που έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις σχετικά με τον χαρακτηρισμό της πιθανής βιοδραστικότητας του ροφήματος. Εκτός των δεδομένων για τους μοριακούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τα συστατικά του καφέ, η συγκεκριμένη μελέτη αναγνώρισε κάποια γονίδια, η υπερέκφραση των οποίων ήταν σε τέτοιο βαθμό που θα επέτρεπε μακροπρόθεσμα την χρήση τους ως *in vivo* βιοδείκτες της επίδρασης του καφέ τόσο στην έκφραση γονιδίων όσο και συνολικά στην

οξειδοαναγωγική κατάσταση, έπειτα από κατανάλωση του, όπως για παράδειγμα το γονίδιο της αναγωγάσης της γλουταθειόνης που αυξήθηκε κατά 14 φορές.

3.3.5 Ικανότητα αναστολής ριζών σουπεροξειδίου και υδροξυλίου

Τα επιλεγμένα εκχυλίσματα καφέ εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν δύο από τις κυριότερες φυσιολογικά παραγόμενες ρίζες (σε αντίθεση με τις τεχνητές ρίζες DPPH· και ABTS^{•+} που μετρήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο).

Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, καθώς ο καφές επέδειξε ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου, κάτι λογικό καθώς το υδροξύλιο είναι δραστικότερη μορφή ROS (68).

Αναλυτικότερα, ως προς την εξουδετέρωση του $O_2^{\cdot-}$, παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα με το καβούρδισμα στην ποικιλία Brazil με το πιο δραστικό να είναι το ελαφρά καβουρδισμένο ενώ μεγαλύτεροι χρόνοι ψησίματος μείωσαν τη δραστηριότητα. Αυτό ήρθε σε απόλυτη συμφωνία με την πλειοψηφία των αποτελεσμάτων του προηγούμενου κεφαλαίου. Εκ διαμέτρου αντίθετη ήταν η εικόνα στην ίδια ποικιλία αναφορικά με τη ρίζα υδροξυλίου, καθώς το πράσινο παρουσίασε διπλάσια δραστηριότητα σε σχέση με όλα τα καβουρδισμένα. Έτσι φάνηκε πως το καβούρδισμα αύξησε μεν την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου, αλλά μείωσε σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας HO^{\cdot} .

Το πράσινο εκχύλισμα στην ποικιλία Robusta είχε μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι και των δυο ριζών συγκριτικά με το αντίστοιχο ψημένο κάτι που δεν συμφωνεί απόλυτα με τις προηγούμενες δοκιμασίες, όπου και τα δυο είχαν παραπλήσια δραστηριότητα. Στην τρίτη ποικιλία (Decaf) όσον αφορά τη ρίζα σουπεροξειδίου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων, ενώ το πράσινο ήταν πιο ισχυρό έναντι της ρίζας HO^{\cdot} , κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναλύονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Με βάση αυτά μπορεί να υποθεθεί ότι η (έστω μικρής κλίμακας) μείωση των ROS και της οξειδωσης μακρομορίων που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, μπορεί εν μέρει να δικαιολογηθεί τόσο από την επαγωγή ενδογενών αμυντικών μηχανισμών, όσο και από την απ' ευθείας ικανότητα των μορίων να εξουδετερώνουν τις ROS και κυρίως το $O_2^{\cdot-}$.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από τις δύο αυτές δοκιμασίες τονίζει τη σημασία της ανάλυσης συγκεκριμένης ομάδας βιοδεικτών με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος λόγω της διαφορετικής ικανότητας των

περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν οξειδωτικά μόρια (142).

3.3.6 Ικανότητα αναστολής των XO και CAT

Στο επόμενο βήμα, τα εκχυλίσματα καφέ εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξειδάση της ξανθίνης και την καταλάση. Τα εκχυλίσματα καφέ επέδειξαν παρεμφερή ικανότητα αναστολής και των δύο ενζύμων. Αναλυτικότερα ως προς την XO, οι τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων κυμάνθησαν από 301,5-1193,5 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχούν σε τιμές ειδικής ενεργότητας από 0,84 (πράσινος Brazil)-3,32 (καβουρδισμένος Robusta) μονάδες. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι και στις τρεις ποικιλίες, το καβούρδισμα ενίσχυσε την ανασταλτική ικανότητα του καφέ συγκριτικά με τα αντίστοιχα πράσινα εκχυλίσματα. Η εικόνα μάλιστα στην ποικιλία Brazil όπου εξετάστηκαν 4 χρόνοι καβουρδίσματος έδειξε ότι το ισχυρότερο είναι το ελαφρύ καβούρδισμα ενώ στη συνέχεια η δραστηριότητα ακολούθησε το πρότυπο που παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές ως προς τα επίπεδα γλουταθειόνης, δηλαδή τα R5 και R6 ήταν λιγότερο δραστικά, ενώ το R7 είχε μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα από τα προηγούμενα δυο. Όσον αφορά τις άλλες δυο ποικιλίες, το καβουρδισμένο Robusta ήταν το ισχυρότερο από τα 9 ενώ στο χαρμάνι Decaf, σε ακόμα μια δοκιμασία φάνηκε πως η απουσία καφεΐνης δεν επηρέασε σημαντικά την ικανότητα των εκχυλισμάτων να δράσουν.

Αναφορικά με την καταλάση, παρατηρήθηκαν παρεμφερείς ικανότητες αναστολής με την XO, και πιο συγκεκριμένα οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 408,1-615,5 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχούν (αντίστροφα) σε τιμές ειδικής ενεργότητας 1,62-2,45. Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που εντοπίστηκε αφορούσε το ελαφρά καβουρδισμένο Brazil (R4), το οποίο ήταν πιο δραστικό από το αντίστοιχο πράσινο.

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να αναστέλλουν τόσο την XO όσο και την καταλάση, που είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταδεικνύει τον πολύπλοκο δράσης αυτού του μίγματος βιοδραστικών ουσιών. Η αναστολή της XO έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία από λακτόνες χλωρογενικών οξέων (μόρια που συναντώνται μόνο στα καβουρδισμένα εκχυλίσματα καθώς παράγονται από τη διαδικασία του καβουρδίσματος) έτσι μπορεί να δικαιολογηθεί η παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ καβουρδισμένων και πράσινων εκχυλισμάτων (223). Η ικανότητα αναστολής της XO θεωρείται θετική καθώς μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών από το συγκεκριμένο ένζυμο. Ωστόσο, σε κάποιες καταστάσεις όπως είναι η αναγέννηση του μυός μετά από μια έντονη άσκηση, έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή ROS και η εμφάνιση

φλεγμονής είναι απαραίτητοι παράγοντες για την ενεργοποίηση των τοπικών βλαστοκυττάρων (δορυφορικά κύτταρα) (224,225). Κατα αυτό τον τρόπο, η αναστολή παραγωγής δραστικών μορφών από την ΧΟ ίσως να μην έχει θετικές επιπτώσεις, άλλωστε η χορήγηση αλλοπουρινόλης (ενός γνωστού αναστολέα της ΧΟ) σε επίμυες πριν την άσκηση είχε αρνητικό αντίκτυπο στην απόδοση (226,227). Ωστόσο, η αναστολή της ΧΟ από τον καφέ θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην περίπτωση της ουρικής αρθρίτιδας, μιας παθολογικής κατάστασης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ενεργότητα της ΧΟ και που οδηγεί στην εναπόθεση του ουρικού οξέος (που παράγεται σε περίσσεια) στις αρθρώσεις (228–230).

Ως προς την καταλάση, η ικανότητα των εκχυλισμάτων καφέ να την αναστέλλει ήταν μη αναμενόμενη δεδομένων όλων των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που είχε παρουσιάσει ως ρόφημα. Η αναστολή της καταλάσης θεωρητικά οδηγεί στη συσσώρευση του εν δυνάμει βλαβερού υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο παρουσία στοιχείων μετάπτωσης μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου (βλέπε [1.3.2](#)). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι σε *in vivo* μελέτες σε επίμυες η χορήγηση καφέ είχε θετική επίδραση στην ενεργότητα της καταλάσης (και της υπεροξειδικής δισμουτάσης) (231,232). Έτσι, παρ' όλη την αναστολή που εμφάνισε ο καφέ *in vitro*, φαίνεται πως η απορρόφηση και ο μεταβολισμός από έναν ζωντανό οργανισμό διαφοροποιούν πλήρως την επίδρασή του.

3.3.7 Τεστ του Ames

Ο έλεγχος της αντιμεταλαξιγόνο δράσης των εκχυλισμάτων καφέ πραγματοποιήθηκε καθώς σε προηγούμενες εργασίες έχει αναφερθεί πιθανή μεταλλαξιγόνο δραστηριότητα του καφέ λόγω ενώσεων που παράγονται κατά το καβούρδισμα όπως η μεθυλογλυοξάλη (37,233,234). Βέβαια αξίζει να αναφερθεί πως η μεταλλαξιγένεση αναφέρθηκε σε πολύ υψηλές δόσεις καφέ (έφταναν και τα ~50mg καφέ ανά τριβλίο).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταρικές σειρές) που δεν ξεπέρασαν τα 300 μg/τριβλίο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλα τα εκχυλίσματα καφέ παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στο τεστ του Ames χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, καθώς μείωσαν δοσοεξαρτώμενα τις παρατηρούμενες αποικίες που οφείλονταν στη μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού παράγοντα. Βέβαια, παρατηρήθηκαν διαφορές στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων καθώς οι τιμές IC₅₀ ποίκιλλαν μεταξύ 51-132 μg/τριβλίο με το ασθενέστερο (μεγαλύτερη τιμή IC₅₀) να είναι το πράσινο Brazil και το ισχυρότερο σε ακόμα μια μέθοδο το ελαφρά καβουρδισμένο Brazil (R4). Η δραστηριότητα

στην ποικιλία Brazil ακολούθησε το πρότυπο των κυτταρικών σειρών ως προς τη γλουταθειόνη καθώς τα R5 και R6 είχαν μειωμένη δράση ενώ στο R7 αυτή αυξήθηκε και πάλι. Στις άλλες δυο ποικιλίες δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ καβουρδισμένου και πράσινου εκχυλίσματος.

Το *t*-BOOH λόγω του μηχανισμού δράσης του (βλέπε [3.1.13.1](#)) μετατρέπεται σε ρίζα κι έτσι τα μόρια του καφέ και κυρίως τα χλωρογενικά θα μπορούσαν να δράσουν αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας τις ρίζες και προστατεύοντας έτσι το DNA από οξειδωτική βλάβη και μεταλλαξιγένεση. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως και τα διτερπένια καφεστόλη και καφεόλη παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση (235).

Τέλος, επιλέχθηκαν τα Brazil R4, R7 και το αντίστοιχο πράσινο για το τεστ Ames με ταυτόχρονη μεταβολική ενεργοποίηση καθώς το μεν R4 ήταν το πιο ισχυρό εκχύλισμα ενώ τα άλλα δύο επιλέχθηκαν για λόγους σύγκρισης τόσο με το πιο έντονο καβούρδισμα (R7) όσο και με το αντίστοιχο πράσινο εκχύλισμα. Η μεταβολική ενεργοποίηση αφορούσε την επώαση των εκχυλισμάτων καφέ με το μίγμα S9, ένα σύνολο μεταβολικών ενζύμων από το ήπαρ αρουραίων που τους έχει χορηγηθεί Aroclor54 για επαγωγή έκφρασης τέτοιων ενζύμων. Κατ' αυτό τον τρόπο φαίνεται η επίδραση του μεταβολισμού στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων, καθώς τα βακτήρια στερούνται των μεταβολικών συστημάτων των ανώτερων ευκαρυωτών.

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν οτ δεν επηρεάστηκε καθόλου η ενεργότητα των δύο καβουρδισμένων δειγμάτων, ωστόσο αυξήθηκε λίγο αυτή του πράσινου εκχυλίσματος σε σχέση με το μη μεταβολισμένο. Συνολικά, φάνηκε οτι ο καφές παρουσιάζει αντιμεταλλαξιγόνο ικανότητα στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, χωρίς να είναι τοξικός για τα βακτήρια.

3.3.8 Ανάλυση σύστασης

Εντοπίστηκε πληθώρα ενώσεων, κυρίως χλωρογενικών οξέων και παραγώγων τους όπως κουμαροϋλοκινικά οξέα, φερουλοϋλοκινικά οξέα και δικαφεϋλοκινικά οξέα. Η διαφορά μεταξύ *C. arabica* και *C. canephora* δεν ήταν εμφανής, με εξαίρεση την παρουσία διαφορετικών ισομερών δικαφεϋλοκινικών και καφεϋλοκινικών οξέων. Εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση μεταξύ καβουρδισμένων και πράσινων εκχυλισμάτων με κυριότερη την παρουσία λακτονών των CGAs στα καβουρδισμένα δείγματα και όχι στα πράσινα (119). Αξίζει να σημειωθεί πως περίπου το 5-7% των CGAs μετατρέπονται στις αντίστοιχες λακτόνες κατά το καβούρδισμα (236,237). Οι λακτόνες των CGAs επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ροφήματος και πιο συγκεκριμένα τη γεύση του. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από τον χρόνο καβουρδίσματος, με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται

στο ελαφρύ προς μέτριο ψήσιμο ενώ μεγαλύτεροι χρόνοι καβουρδίσματος έχουν αρνητικό αντίκτυπο, μειώνοντας τις λακτόνες, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (237). Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν αρκετά παράγωγα φερουλοϋλοκινικού οξέος στα καβουρδισμένα δείγματα και μία πιθανή εξήγηση έγκειται στην απελευθέρωση τους από τα αμινοξέα στα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα φυσιολογικά, ελέω καβουρδίσματος (238). Μια ακόμα διαφορά μεταξύ πράσινων και καβουρδισμένων εκχυλισμάτων αφορούσε την μετατροπή των καρβοξυτρακτυλοσιδών των πρώτων σε ατρακτυλοσίδες στα δεύτερα λόγω του ψησίματος (239). Ακόμα, ο χρόνος καβουρδίσματος επηρεάζει τη σύσταση καθώς φάνηκε πως το πιο καβουρδισμένο εκχύλισμα (R7) έχει διαφορετικό προφίλ.

Στη συνέχεια αναλύθηκε ποσοτικά η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε καφεΐνη και 3-, 4- και 5-μονοκαφεϋλοκινικό οξύ καθώς αυτά τα τρία ήταν τα κύρια είδη χλωρογενικών οξέων. Με βάση τα αποτελέσματα, το είδος Robusta περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα καφεΐνης, κάτι αναμενόμενο με βάση τη βιβλιογραφία (240). Ωστόσο, τόσο στην ποικιλία Brazil, όσο και στην Robusta παρατηρήθηκε μικρότερη ποσότητα καφεΐνης στα πράσινα εκχυλίσματα. Αυτό έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία και σχετίζεται με την απώλεια μάζας λόγω αφυδάτωσης του κόκκου κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος σε συνδυασμό με την μέθοδο προετοιμασίας του εκχυλίσματος (241,242).

Όσον αφορά τα χλωρογενικά οξέα, παρατηρήθηκε πτώση τους με το καβούρδισμα στις ποικιλίες *C. arabica* (Brazil και Decaf) καθώς στην πρώτη από 30,23 mg/g στο ελαφρά καβουρδισμένο μειώθηκε χρονοεξαρτώμενα στα 8,15 mg/g στο R7 ενώ στην ντεκαφεϊνέ ποικιλία το καβουρδισμένο είχε 40,5% μειωμένη περιεκτικότητα σε CGAs συγκριτικά με το αντίστοιχο πράσινο. Μία σημαντική παρατήρηση έχει να κάνει με το γεγονός ότι ο πράσινος Brazil παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα CGAs κάτι που ήταν μη αναμενόμενο. Θεωρητικά οι πράσινοι κόκκοι έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωρογενικά οξέα, ενώ με το καβούρδισμα η περιεκτικότητα αυτή μειώνεται λόγω αποικοδόμησης τους ή ενσωμάτωσης στις μελανοϊδίνες (243,244). Ωστόσο η εξήγηση για αυτή την παρατήρηση ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία διμερών χλωρογενικών οξέων που εντοπίστηκαν μόνο στο πράσινο εκχύλισμα. Όπως φάνηκε και στο χρωματογράφημα του πράσινου δείγματος, εντοπίστηκε μια κορυφή στα m/z 705,16 ($tR=11,09$ min) που αντιστοιχεί σε διμερές και δεν υπάρχει στα καβουρδισμένα δείγματα.

Συνολικά, το δείγμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωρογενικά οξέα ήταν το ελαφρά καβουρδισμένο, κάτι που συμπίπτει με την υψηλή δραστηριότητα που επέδειξε στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων δοκιμασιών.

Η ανάλυση των CQAs έδειξε πως το 5-CQA (νεοχλωρογενικό οξύ) ήταν το αφθονότερο και στα δύο είδη καφέ συγκριτικά με τα 3-CQA (χλωρογενικό οξύ) και 4-CQA (κρυπτοχλωρογενικό οξύ), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (119,146), αν και σε άλλες αναφορές το 3-CQA βρέθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση (245). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχει διαφωνία σχετικά με την ονομασία των 3- και 5-CQA και συχνά μπερδεύονται (246).

Επιπρόσθετα, η αναλογική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων στα 3 ισομερή ποικίλλει αναλόγως του βαθμού καβουρδίσματος όπως φάνηκε στην ποικιλία Brazil, καθώς αυξάνεται η αναλογία σε 3- και 4- χλωρογενικά οξέα με την πάροδο του χρόνου στα R5 και R6 συγκριτικά με το R4. Η εικόνα πάντως διαφοροποιήθηκε στο R7 όπου πιθανώς λόγω του εκτεταμένου χρόνου καβουρδίσματος μειώθηκε δραστικά το 3-CQA.

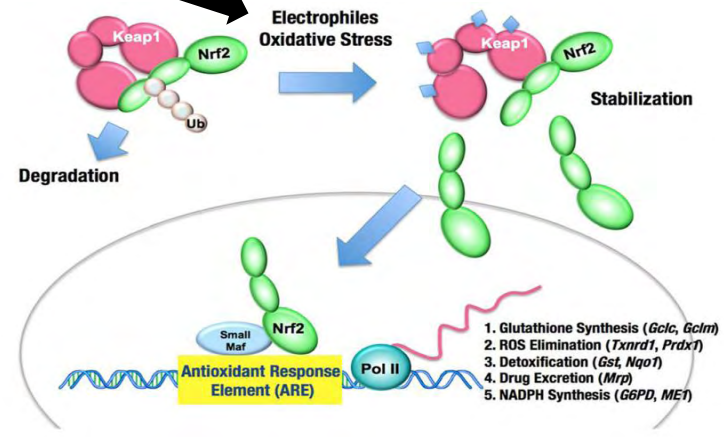
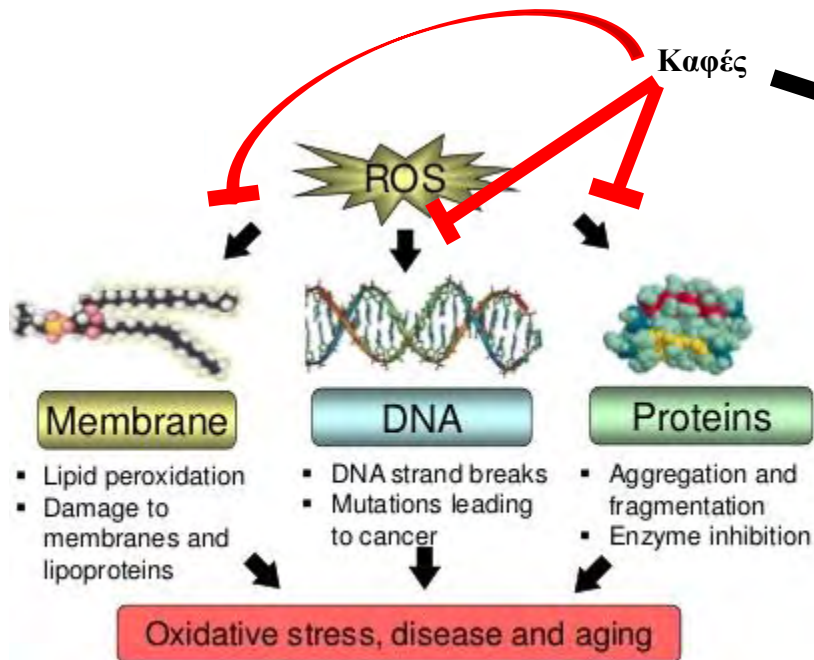
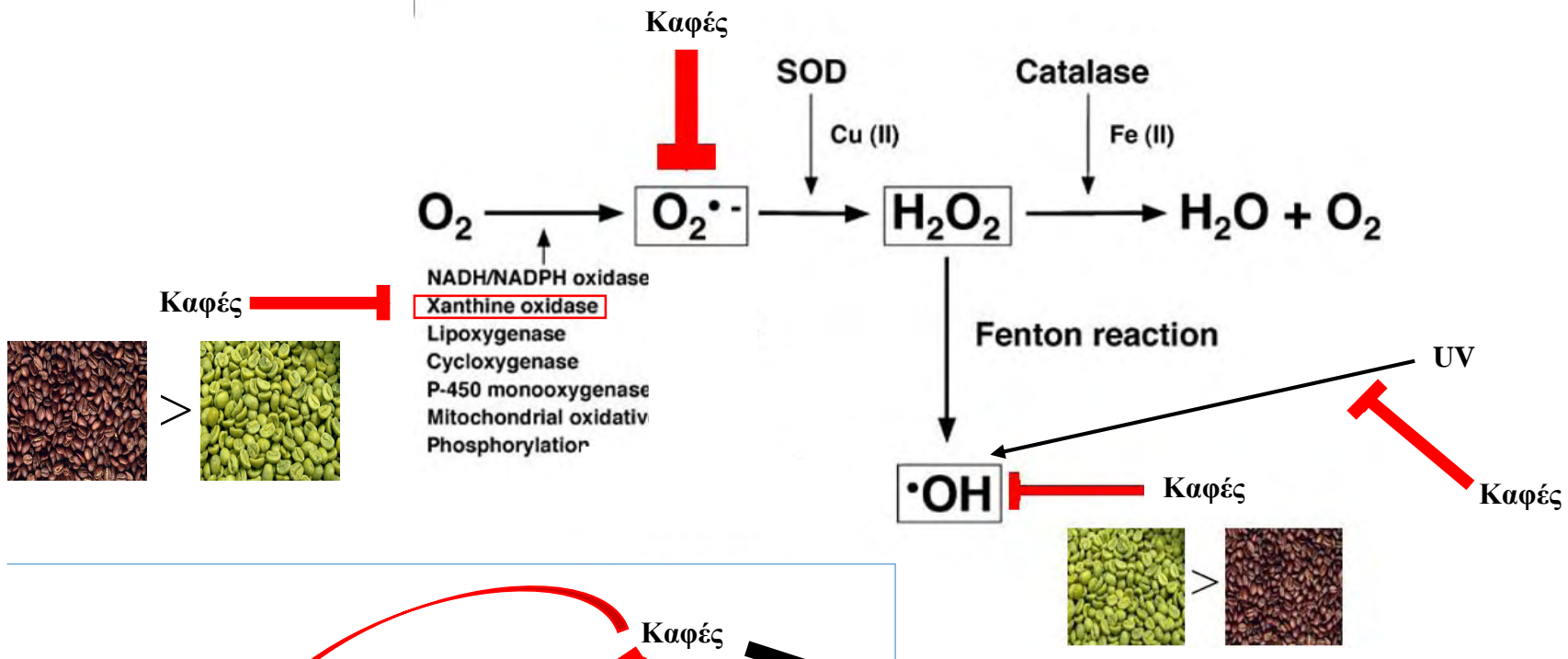
Το σύνολο των ανωτέρω μορίων και κυρίως των χλωρογενικών οξέων προσδίδουν στα εκχυλίσματα καφέ τα παρατηρούμενες ιδιότητες τους, πέραν των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Σύμφωνα και με προηγούμενες εργασίες, τα CGAs παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες καθώς είναι μεταξύ άλλων αντιοξειδωτικά (18,247), έχουν νευροπροστατευτική ικανότητα (248), μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (249), έχουν υπογλυκαιμική και αντιδιαβητική δράση και μειώνουν την οξείδωση λιπιδίων του κυκλοφορικού συστήματος (250).

Η απορρόφηση των CGAs, μπορεί να είναι μεγαλύτερη από αυτή της πλειονότητας των πολυφαινόλων, ωστόσο εμφανίζει πολύπλοκο χαρακτήρα καθώς δεν είναι δοσοεξαρτώμενη, αλλά επηρεάζεται από την αρχικά χορηγούμενη δόση. Σύμφωνα με μία έρευνα στην οποία χορηγήθηκαν τρία ροφήματα καφέ χαμηλής, μέτριας και υψηλής περιεκτικότητας σε CGA αντίστοιχα, η υψηλότερη ποσότητα χλωρογενικών στο αίμα εντοπίστηκε από τη μέτρια δόση (251). Η περίσσεια των CGAs καταλήγει στο κόλον όπου και αλληλεπιδρά με την τοπική μικροχλωρίδα και υφίσταται μεταβολισμό, παράγοντας ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους όπως το διϋδροκαφεϊκό οξύ, το διϋδροφερουλικό οξύ και το 3-(3'-υδροξυφαινυλ)προπιονικό οξύ (252). Επιπρόσθετα, τα CGAs καθώς και οι απορροφούμενοι μικροβιακοί μεταβολίτες τους μεταβολίζονται περαιτέρω από τα ενδογενή ένζυμα των φάσεων I και II του μεταβολισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μένει άθικτο μόνο ένα μικρό ποσοστό των αρχικών μορίων CGA και να

κυριαρχούν οι σουλφονυλιωμένες και οι γλυκουρονυλιωμένες μορφές τους (251). Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί πως τα CGAs και οι μεταβολίτες τους όταν βρίσκονται στην κυκλοφορία αλληλεπιδρούν με την αλβουμίνη για την οποία έχουν μεγάλη συγγένεια (253). Η αλβουμίνη δρα ως αποθήκη, επιτρέποντας την παράταση του χρόνου ημιζωής τους στο πλάσμα.

3.3.9 Προτεινόμενοι μοριακοί μηχανισμοί δράσης του καφέ

Σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στα πρώτα δύο στάδια της διατριβής, μπορεί να σχηματιστεί η παρακάτω εικόνα που απεικονίζει τους πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς δράσης του καφέ σε έναν οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, τα βιοδραστικά του μόρια επέδειξαν ικανότητα εξουδετέρωσης και αναστολής της παραγωγής ελευθέρων ριζών, προστατευτική δράση έναντι των οξειδωτικών βλαβών που προκαλούνται στα μακρομόρια καθώς και επαγωγή των ενδογενών μηχανισμών αντιοξειδωτικής άμυνας με τελικό αποτέλεσμα τη βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 29:



Συγκέντρωση πολυφαινολών



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Επίδραση εκχυλίσματος καφέ στην
οξειδοαναγωγική κατάσταση και την έκφραση αντιοξειδωτικών
ενζύμων επιμύων**

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο της παρούσας έρευνας επιλέχθηκε το ισχυρότερο εκχύλισμα με βάση τα προηγούμενα δύο στάδια ώστε να χορηγηθεί σε επίμυες. Πιο συγκεκριμένα, το ελαφρά καβουρδισμένο εκχύλισμα της ποικιλίας Brazil (Roasted 4 min) χορηγήθηκε για 2 εβδομάδες στο νερό επιμύων σε δόση που αντιστοιχεί με μέτρια καθημερινή κατανάλωση στους ανθρώπους. Ο σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης του καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος και των ιστών, ώστε να αποσαφηνιστεί αν η δραστηριότητα που εμφάνισε στις *in vitro* δοκιμές μεταφράζεται παρομοίως και *in vivo*. Η μέτρηση πληθώρας βιοδεικτών καθώς και η επίδραση στα επίπεδα έκφρασης σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να προσφέρει μια πλήρη εικόνα για τη δράση του καφέ και την πιθανή ιστο-ειδικότητά της. Τα αποτελέσματα αναμένεται να προσθέσουν βάθος στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς σε παλιότερες μελέτες δεν εξετάστηκε τόσο μεγάλος αριθμός ιστών και δεν πραγματοποιήθηκε τόσο ευρεία μελέτη βιοδεικτών.

4.1 Χορήγηση καφέ σε επίμυες και συλλογή ιστών

4.1.1 Εκχύλισμα καφέ και πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκαν 12 ένηβοι (ηλικίας 3 μηνών) αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar (μέσο βάρος: $192,1 \pm 13,5$ g). Χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες των έξι ζώων (ομάδα ελέγχου και πειραματική ομάδα) και είχαν κοινή διατροφή με μόνη εξαίρεση τη χορήγηση του εκχυλίσματος στη δεύτερη ομάδα. Η χορήγηση του εκχυλίσματος καφέ έγινε μέσω του νερού τους και η διάρκεια του πειράματος ήταν 14 μέρες. Η δοσολογία ήταν 7,5 ml/kg σωματικού βάρους/ημέρα που αντιστοιχούσε σε 750 mg καφέ. Η συγκεκριμένη δοσολογία αντιστοιχεί σε ανθρώπινη κατανάλωση 3-4 κουπών καφέ ημερησίως, που θεωρείται φυσιολογική κατανάλωση. Η συγκεκριμένη δόση επιλέχθηκε από συνδυασμό δεδομένων της βιβλιογραφίας αλλά και των προαναφερθεισών *in vitro* πειραματικών διαδικασιών που υπέδειξαν ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα στη συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι το πιο ισχυρό (254–260).

4.1.2 Συλλογή αίματος και ιστών

Μετά την πάροδο των 2 εβδομάδων, οι επίμυες θανατώθηκαν και λήφθηκε το αίμα μέσω παρακέντησης της καρδιάς, ενώ ταυτόχρονα συλλέχθηκαν 11 ιστοί προς μελέτη (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ, νεφρός, πάγκρεας, σπλήνας, καρδιά, πνεύμονας, τετρακέφαλος και εγκέφαλος). Το αίμα αποθηκεύτηκε σε ειδικά σωληνάκια με EDTA, ενώ οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασέτες και βυθίστηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο. Οι ανωτέρω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Ταϊτζόγλου.

4.1.3 Επεξεργασία αίματος και ομογενοποίηση ιστών

4.1.3.1 Επεξεργασία αίματος

Το ολικό αίμα αμέσως μετά τη λήψη του διαχωρίστηκε σε πλάσμα και ερυθροκύτταρα καθώς στο πρώτο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC), των TBARS και των CARB, ενώ στο δεύτερο η μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης και της ικανότητας διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο διαχωρισμός έγινε μέσω φυγοκέντρησης (1370 g, 10 min, 4°C) μετά το πέρας της οποίας το πλάσμα μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια και τοποθετήθηκε στους -80°C. Στα ερυθροκύτταρα (ίζημα) προστέθηκε απιονισμένο H₂O₂ (1:1 v/v), ανακινήθηκαν βίαια και φυγοκεντρήθηκαν (4000

g, 15 min, 4°C). Το υπερκείμενο (RBCL) μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια και φυλάχθηκε στους -80°C.

Ο προσδιορισμός της γλουταθειόνης στο RBCL απαιτεί δύο βήματα καθαρισμού. Αναλυτικότερα, σε 500 μl RBCL προστέθηκαν 500μl TCA (5%), αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min, 5°C). Τριακόσια μl του υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάκια και προστέθηκαν σε αυτά 90 μl TCA (5%). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min, 5°C) ξανά και τέλος το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

4.1.3.2 Ομογενοποίηση ιστών

Για την ομογενοποίηση των ιστών ζυγίστηκαν 100 mg κάθε ιστού και προστέθηκαν 900 μl PBS (αναλογία 1:10 w/v). Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικού ομογενοποιητή και στη συνέχεια υπέστησαν λύση μέσω υπερήχων (για 1 min, 70% amplitude, 0,7 sec cycle) με τη βοήθεια ειδικού μηχανήματος. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε (5.000 g, 5 min, 5°C) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

4.1.4 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης τόσο των ιστών όσο και του αίματος έγινε μέσω του προσδιορισμού 5 βιοδεικτών, 3 σχετικών με την αντιοξειδωτική ικανότητα (ανηγμένη γλουταθειόνη, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητα διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου) και 2 που αποτιμούν τις οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια και πρωτεΐνες (TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια).

4.1.4.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford

Βλέπε την παράγραφο [3.1.5](#)

4.1.4.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης βασίστηκε στην οξείδωσή της από το διθειόδο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) που την μετατρέπει στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) ενώ ταυτόχρονα παράγεται το χρωμογόνο 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ που απορροφά στα 412 nm. Η μέτρηση στο RBCL πραγματοποιήθηκε αναμιγνύοντας 20 μL RBCL με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,95) και διάλυμα DTNB (1 mM σε 1% κιτρικό νάτριο w/v). Τα δείγματα αναμίχθηκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 15 min ενώ τέλος μετρήθηκε η οπτική

απορρόφηση στα 412 nm. Ο μάρτυρας περιείχε PBS αντί για RBCL. Όσον αφορά τους ιστούς, απαιτήθηκε ένα βήμα καθαρισμού, κατά το οποίο 100 μl ιστού αναμίχθηκαν με 100 μl TCA (5%) και φυγοκεντρήθηκαν (15.000 g, 5 min, 5°C). Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε όπως το RBCL.

Η έκφραση των αποτελεσμάτων στο RBCL έγινε ως εξής:

$$GSH \left(\frac{\mu mol}{g Hb} \right) = \frac{[(\frac{Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} - Abs_{\mu\acute{\alpha}\rho\tau\upsilon\rho\alpha}}{13,6}) \times 262,6] \times 1000}{Hb \left(\frac{g}{L} \right)}$$

$Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma}$: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος.

$Abs_{\mu\acute{\alpha}\rho\tau\upsilon\rho\alpha}$: Η απορρόφηση του μάρτυρα.

13,6: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

262,6: Η αραίωση που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (1010μl) με τον όγκο του RBCL (20μl), αν πολλαπλασιαστεί με 2 για να ληφθεί υπόψιν η αρχική αραίωση με το dH₂O κατά τη διαδικασία λύσης (1:1) και τέλος πολλαπλασιάζοντας με το 2 και το 1,3 λόγω της αραίωσης από τις δύο προσθήκες του TCA.

1000: Για τη μετατροπή mmol/L σε μmol/ml

Στους ιστούς η αντίστοιχη εξίσωση είναι:

$$GSH \left(\frac{\mu mol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{[(\frac{Abs_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma} - Abs_{\mu\acute{\alpha}\rho\tau\upsilon\rho\alpha}}{13,6}) \times 51] \times 1000}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{mL} \right)}$$

51: η αραίωση του δείγματος στον τελικό όγκο της αντίδρασης

4.1.4.3 Ικανότητα διάσπασης H₂O₂

Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Aebi (174), σύμφωνα με το οποίο 4-40 μl ιστού (αναλόγως του ιστού) ή 4 μl RBCL (αραιωμένου σε αναλογία 1:10 με dH₂O) αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) και επώαστηκαν στους 37°C για 10 min. Κατόπιν, προστέθηκαν 5 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου (30%) και μετρήθηκε η μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm για 2 min.

Η ικανότητα διάσπασης του H₂O₂ στο RBCL υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Ικανότητα διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{U}}{\text{mg Hb}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right) \times 15000 \times 1000}{\text{Hb} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

40: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ σε (M⁻¹×cm⁻¹)

15000: Η αραιώση του RBCL στην αντίδραση

ΔAbs (min) = η μεταβολή της απορρόφησης ανά min.

Στον ιστό έχει ως εξής:

$$\text{Ικανότητα διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{U}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right) \times Y \times 1000}{\text{Hb} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Y: η αραιώση του ιστού στην αντίδραση, διαφορετική αναλόγως του ιστού (75-750)

4.1.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Η TAC αφορά την ικανότητα των συστατικών τόσο του πλάσματος όσο και των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Και τα δύο αυτά δείγματα περιέχουν πληθώρα συστατικών που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο καθένα συνεισφέρει σε διαφορετικό βαθμό.

Ως προς τη μέθοδο βασίζεται στο πρωτόκολλο των Janaszewska και συνεργατών (261), όπου ο προσδιορισμός της TAC γίνεται με τη βοήθεια του DPPH·, το οποίο εξουδετερώνεται από τα αντιοξειδωτικά συστατικά και έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η απορρόφηση του στα 520 nm.

Πιο συγκεκριμένα, 20 μl ιστού ή πλάσματος αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (10 mM, pH 7,4) και διάλυμα DPPH· (0,1 mM σε μεθανόλη). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 45 min στο σκοτάδι. Τέλος, φυγοκεντρήθηκαν (15000 g, 3 min, θερμοκρασία δωματίου) και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του υπερκειμένου στα 520 nm.

Στο πλάσμα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως εξής:

$$\frac{\mu\text{mol DPPH που εξουδετερώθηκε}}{\text{mL πλάσματος}} = \left(\left[\frac{(\text{Abs}_{\text{μάρτυρα}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}})}{\text{Abs}_{\text{μάρτυρα}}} \right] \times 100\% \right) \times 40$$

Abs_{μάρτυρα}: Η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

Abs_{δείγματος}: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

40: ο αριθμός που προκύπτει από τον συμψηφισμό της αραίωσης του δείγματος στην αντίδραση, τη συγκέντρωση του DPPH· στην αντίδραση, τη μετατροπή του ποσοστού σε απλό αριθμό και την μετατροπή των l πλάσματος σε ml.

Στους ιστούς, η έκφραση βασίστηκε στην ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχεται σε κάθε δείγμα:

$$\frac{\mu\text{mol DPPH που εξουδετερώθηκε}}{\text{mg πρωτεΐνης}} = \frac{\left(\left[\frac{(Abs_{\text{μάρτυρα}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{μάρτυρα}}} \right] \times 100\% \right) \times 40}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

4.1.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Βλέπε παράγραφο 3.1.6. Η μόνη διαφορά έγκειται στην ποσότητα ιστού που χρησιμοποιήθηκε, καθώς για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20ml ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος. Αυτό είχε επίπτωση και στην εξίσωση προσδιορισμού των TBARS που πήρε την παρακάτω μορφή:

$$TBARS \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\delta} - A_0}{1,56 \times 10^5}}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \right) \times 1700$$

A_{δ} : Η οπτικής απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

$1,56 \times 10^5$: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

1700: Ο λόγος του συνολικού όγκου της αντίδρασης ως προς τον όγκο του δείγματος σε μl

4.1.4.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

Βλέπε παράγραφο 3.1.7. Η μόνη διαφορά και σε αυτή την περίπτωση έγκειται στον όγκο του δείγματος, καθώς για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20 μl ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος. Αυτό είχε επίπτωση και στην εξίσωση προσδιορισμού των CARB που πήρε την παρακάτω μορφή:

$$CARB \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\delta} - A_0}{0,022}}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \right) \times 50$$

A_{δ} : Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

0,022: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNP ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

50: Ο λόγος του συνολικού όγκου της αντίδρασης ως προς τον όγκο του δείγματος

4.1.5 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων του Nrf2 μέσω Real-time PCR

Βλέπε παράγραφο 3.1.8. Η διαφορά έγκειται στο ότι το RNA απομονώθηκε από ιστό και όχι από κυτταρικό αιώρημα, ενώ ως γονίδιο κανονικοποίησης επιλέχθηκε αυτό της β-ακτίνη (*actin*). Τα γονίδια που ενισχύθηκαν ήταν αυτό της καταλυτικής υπομονάδας της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (*gclc*), της καταλάσης (*cat*) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (*sod1*), οι εκκινητές των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή είναι ίδιες με αυτές των κυττάρων (45 κύκλοι από 15 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55°C, 30 sec στους 72°C).

Πίνακας 19: Οι ακολουθίες των εκκινητών για τους επίμυες

Γονίδιο	Gene ID	Εκκινητής (5'-3')
<i>cat</i>	24248	Forward: <i>TTCTACACTGAAGATGGTAACTG</i> Reverse: <i>GAAAGTAACCTGATGGAGAGAC</i>
<i>sod1</i>	24786	Forward: <i>AACCAGTTGTGGTGTTCAGGA</i> Reverse: <i>CTCCTGAGAGTGAGATCACA</i>
<i>gclc</i>	25283	Forward: <i>CAGAGTATGGGAGTTACATGATTGAAG</i> Reverse: <i>TGTGTTGAACTCGGACATCGTT</i>
<i>actin</i>	81822	Forward: <i>AGCCATGTACGTAGCCATCC</i> Reverse: <i>TCGGAACCGCTCATTGCCG</i>

4.1.6 Αποτίμηση επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων των τριών γονιδίων που μελετήθηκαν (γ-GCL, CAT, SOD1) έγινε μέσω ανοσοσύπωσης ή αλλιώς Western blot. Πιο συγκεκριμένα, 30 μg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα ιστού αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer 5x) και επώαστηκαν για 3 min στους 95°C. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 8%, υπό διατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες για 45 min στα 150 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες των πρωτεϊνών μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF με τη μέθοδο της υγρής μεταφοράς. Αναλυτικότερα, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κασετίνα που περιείχε τα εξής: σφουγγάρι, διηθητικό χαρτί Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί και σφουγγάρι. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 2 ώρες στα 110 V.

Επόμενο βήμα ήταν το μπλοκάρισμα της μεμβράνης με τη βοήθεια των πρωτεϊνών αποβουτυρωμένου γάλακτος (5% w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST (Tris, NaCl, TWEEN 20)

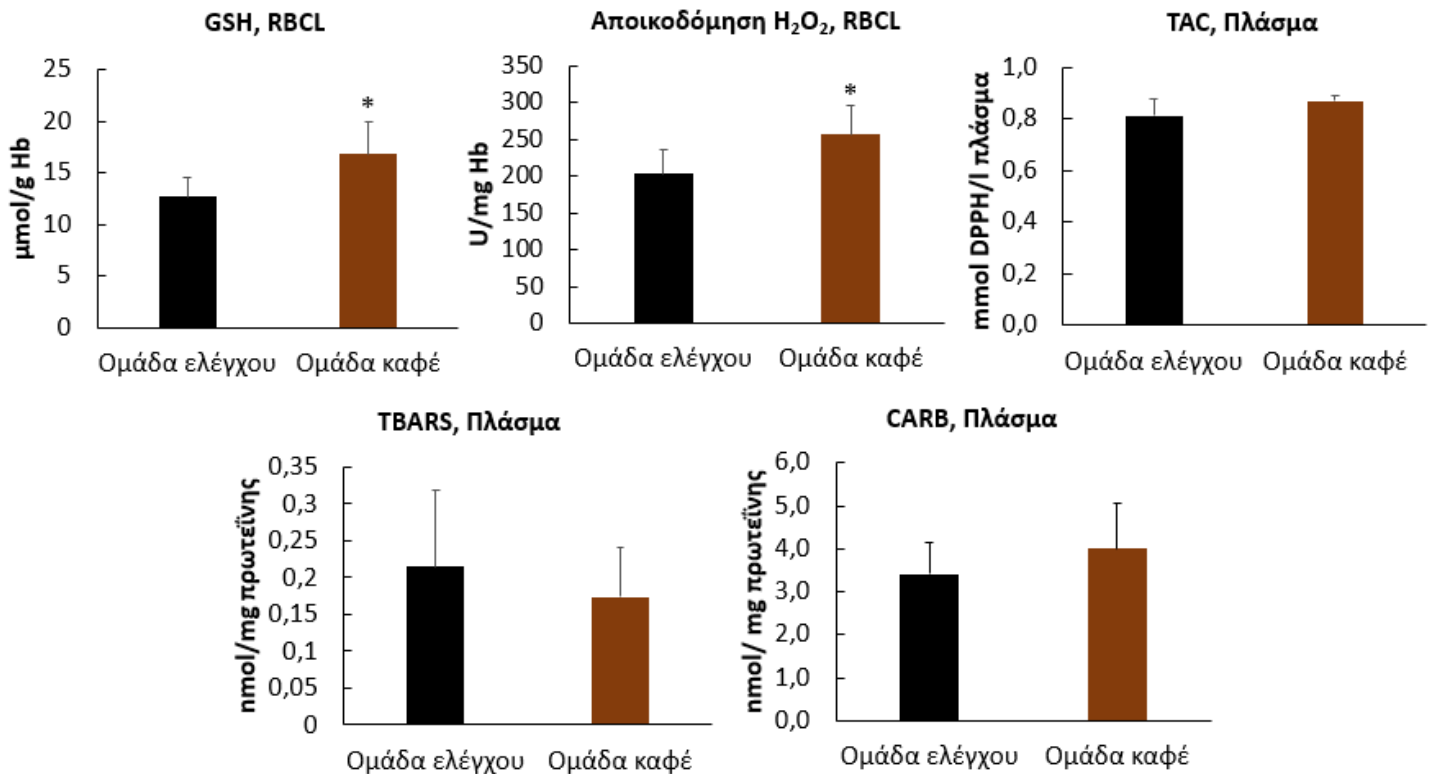
στους 4°C, ολονύχτια. Κατόπιν, η μεμβράνη επώαστηκε με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα (anti-γ-GCL 1:600; anti-CAT 1:400; anti-SOD1 1:600) για 1 ώρα σε διάλυμα TBST με 5% w/v γάλα. Έπειτα από 5 πλύσεις των 5 min με TBST, η μεμβράνη επώαστηκε με το αντίστοιχο δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit 1:5000; anti-goat 1:3000) για 30 min σε TBST με 5% γάλα. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές με TBST για 15 min και ακολούθως εκτέθηκαν στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (ECL) για 1 min και τοποθετήθηκαν σε ειδική θήκη όπου ανιχνεύτηκαν σε σκοτεινό θάλαμο οι ζώνες των πρωτεϊνών σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) χρησιμοποιήθηκε ως μόριο κανονικοποίησης. Τέλος, τα σχετικά επίπεδα των ζωνών αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Alpha Innotech.

4.1.7 Στατιστική Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS 20.0 και συγκεκριμένα η one-way ANOVA με στάθμη σημαντικότητας το $p < 0,05$.

4.2 Αποτελέσματα

4.2.1 Δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο αίμα

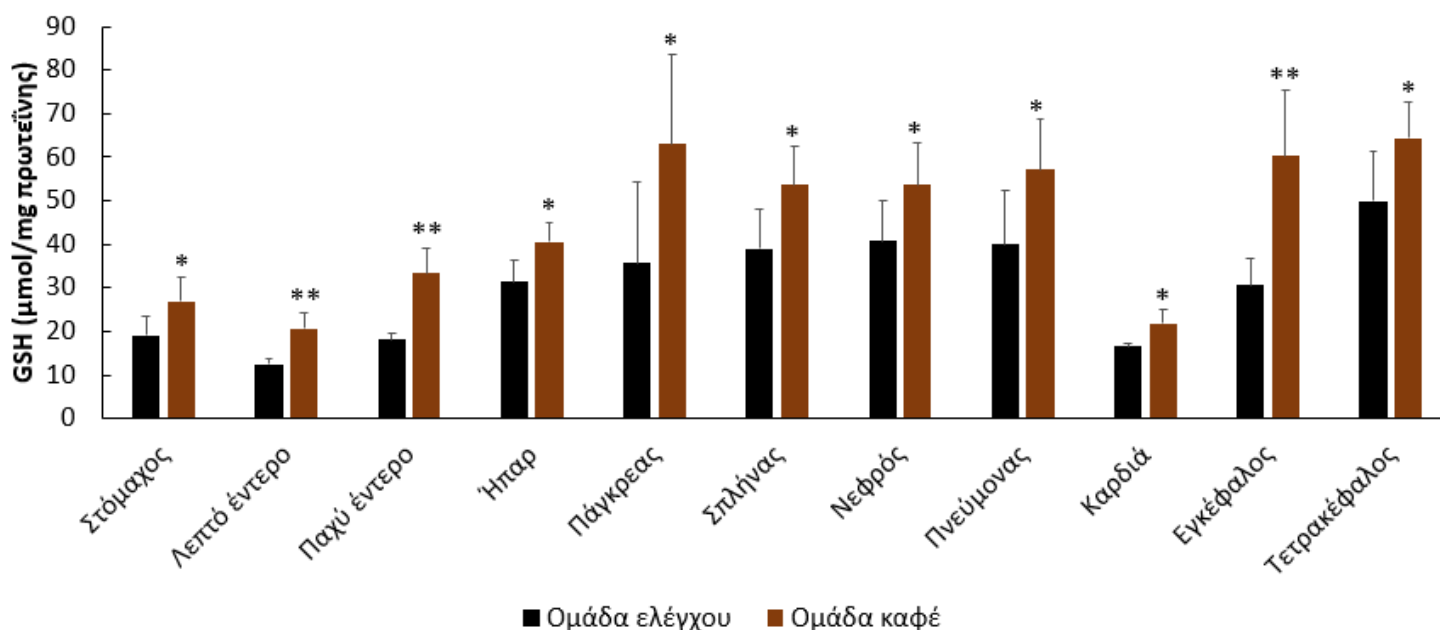


Διάγραμμα 30: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). RBCL: Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα; GSH: Ανηγμένη γλουταθειόνη; H₂O₂: Υπεροξειδίου του υδρογόνου; TAC: Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα; TBARS: Ουσίες που Αλληλεπιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ; CARB: Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 30, στο αίμα των επιμύων εντοπίστηκαν δύο στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ομάδα που κατανάλωσε το εκχύλισμα καφέ και αφορούσαν τη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (αύξηση 32,9%) και την ικανότητα αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία αυξήθηκε κατά 26,3%.

4.2.2 Δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς

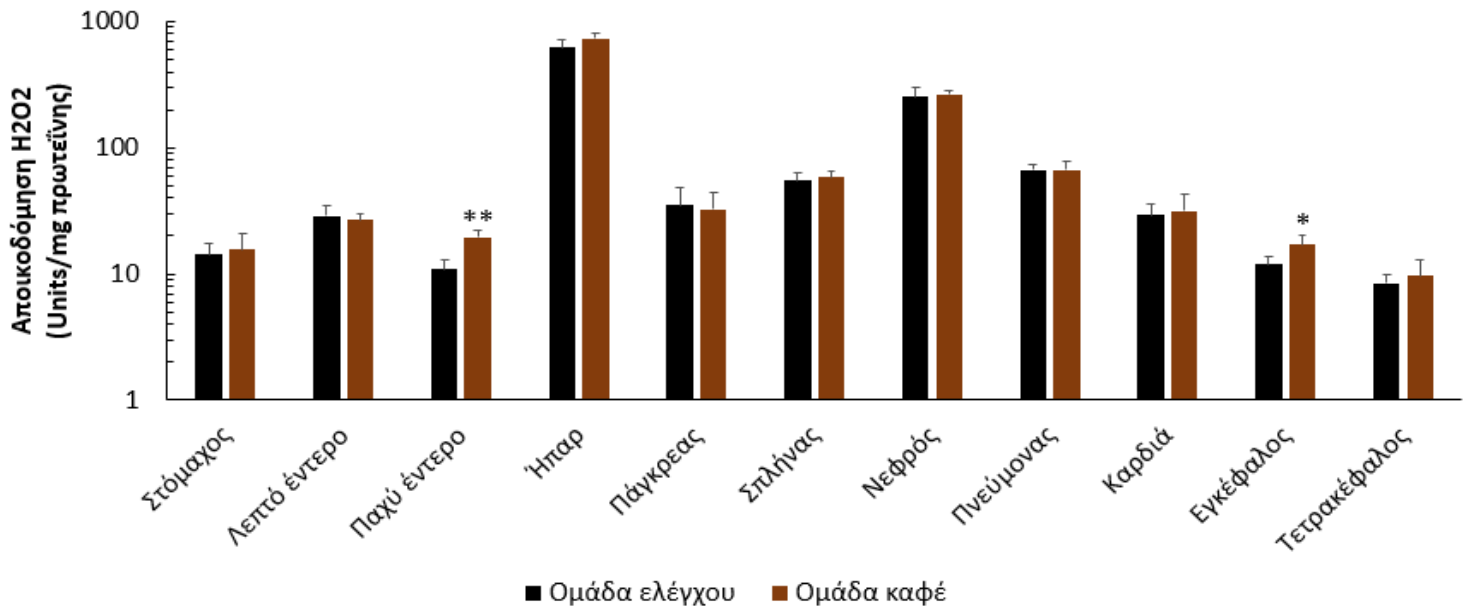
4.2.2.1 Επίπεδα GSH



Διάγραμμα 31: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε ιστούς επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). GSH: Ανηγμένη γλουταθειόνη

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 31, η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα καφέ παρουσίασε αύξηση στα επίπεδα της GSH σε όλους τους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, στον στόμαχο αυξήθηκε κατά 41,1%, στο λεπτό έντερο κατά 67,0%, στο παχύ έντερο κατά 84,3%, στο ήπαρ κατά 29,8%, στο πάγκρεας αυξήθηκε κατά 76,5%, στο σπλήνα κατά 37,8%, στον νεφρό κατά 31,3%, στον πνεύμονα κατά 43,4%, στην καρδιά κατά 31,3%, στον εγκέφαλο κατά 97,1% και στον τετρακέφαλο κατά 29,2%.

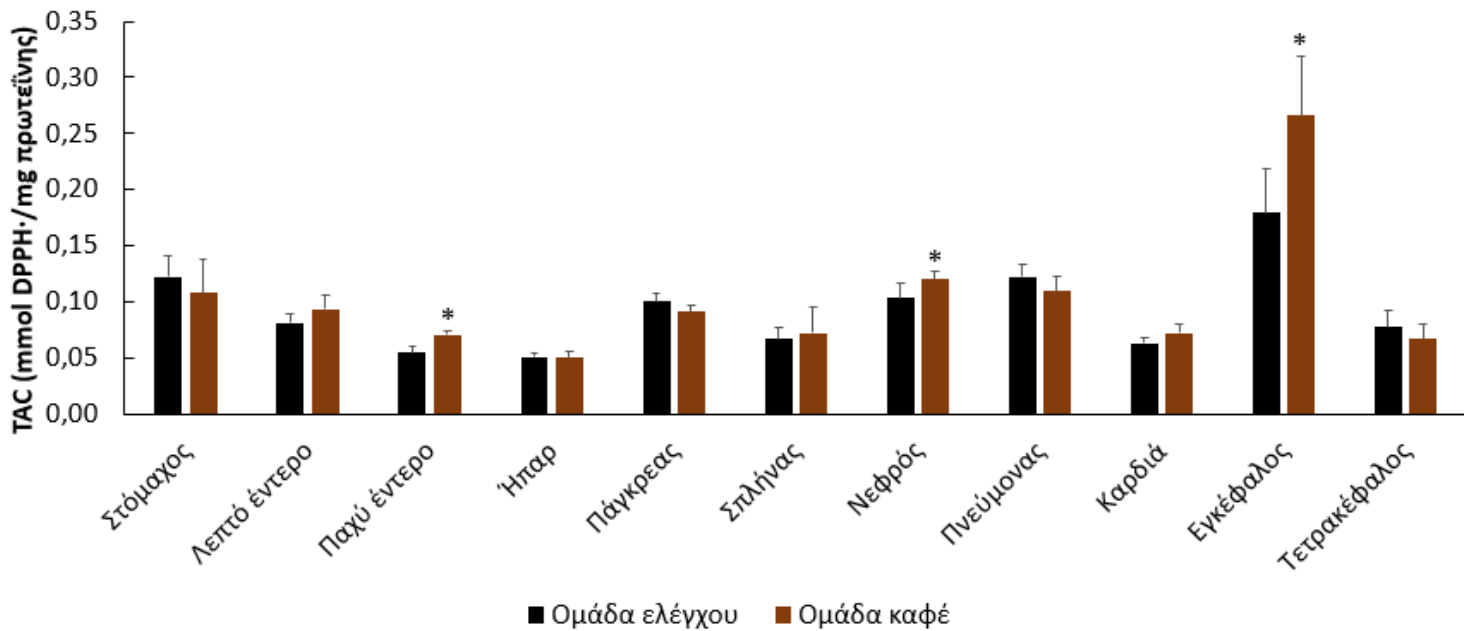
4.2.2.2 Αποικοδόμηση H₂O₂



Διάγραμμα 32: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στην ικανότητα αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ιστούς επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). H₂O₂: Υπεροξείδιο του υδρογόνου

Ο δεύτερος δείκτης αφορούσε την ικανότητα διάσπασης του H₂O₂. Μόλις σε δύο ιστούς (παχύ έντερο και εγκέφαλος) παρατηρήθηκε αύξηση στην ικανότητα διάσπασης από το εκχύλισμα καφέ, κατά 80,1% και 43,6% αντίστοιχα.

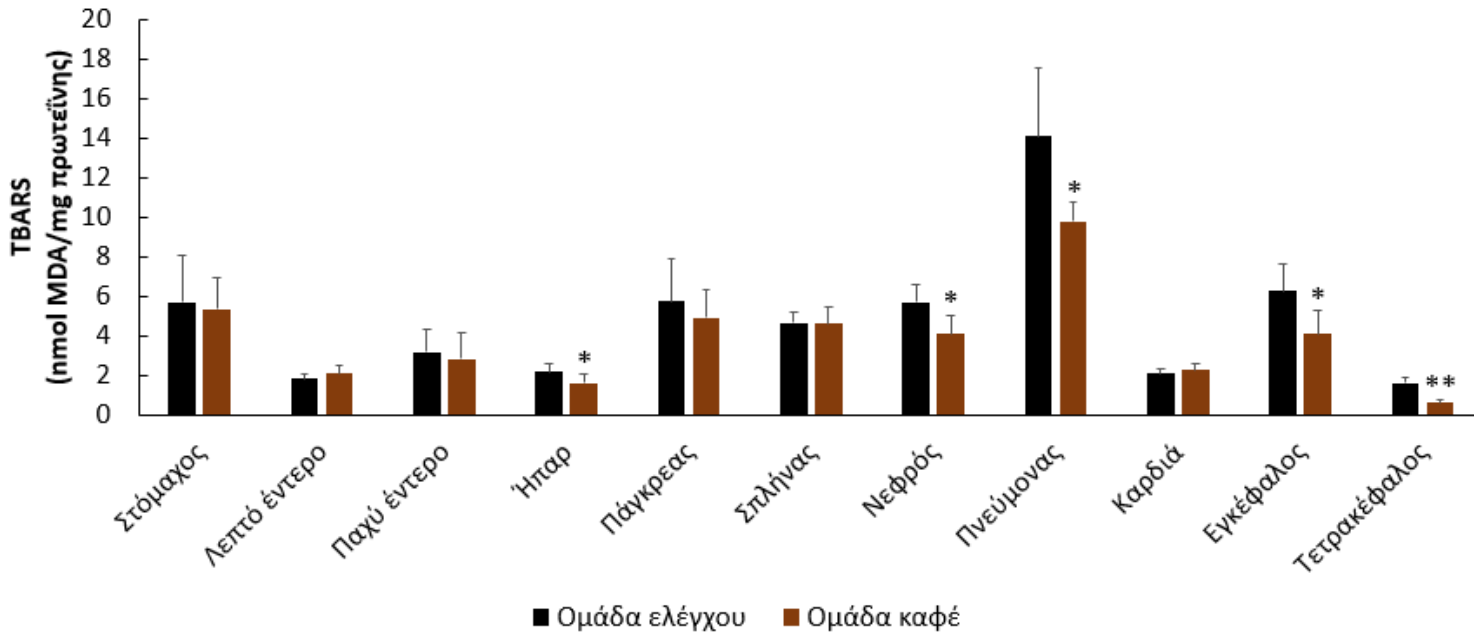
4.2.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)



Διάγραμμα 33: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ιστούς επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). TAC: Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Ο τρίτος δείκτης αντικατοπτρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός ιστού ως προς την εξουδετέρωση μιας ρίζας και σύμφωνα με τα αποτελέσματα μόνο το παχύ έντερο, ο νεφρός και ο εγκέφαλος παρουσίασαν αυξημένη TAC έπειτα από κατανάλωση εκχυλίσματος καφέ. Αναλυτικότερα, στο παχύ έντερο αυξήθηκε κατά 28,3%, στον νεφρό κατά 16%, ενώ στον εγκέφαλο έφτασε το 48,4%.

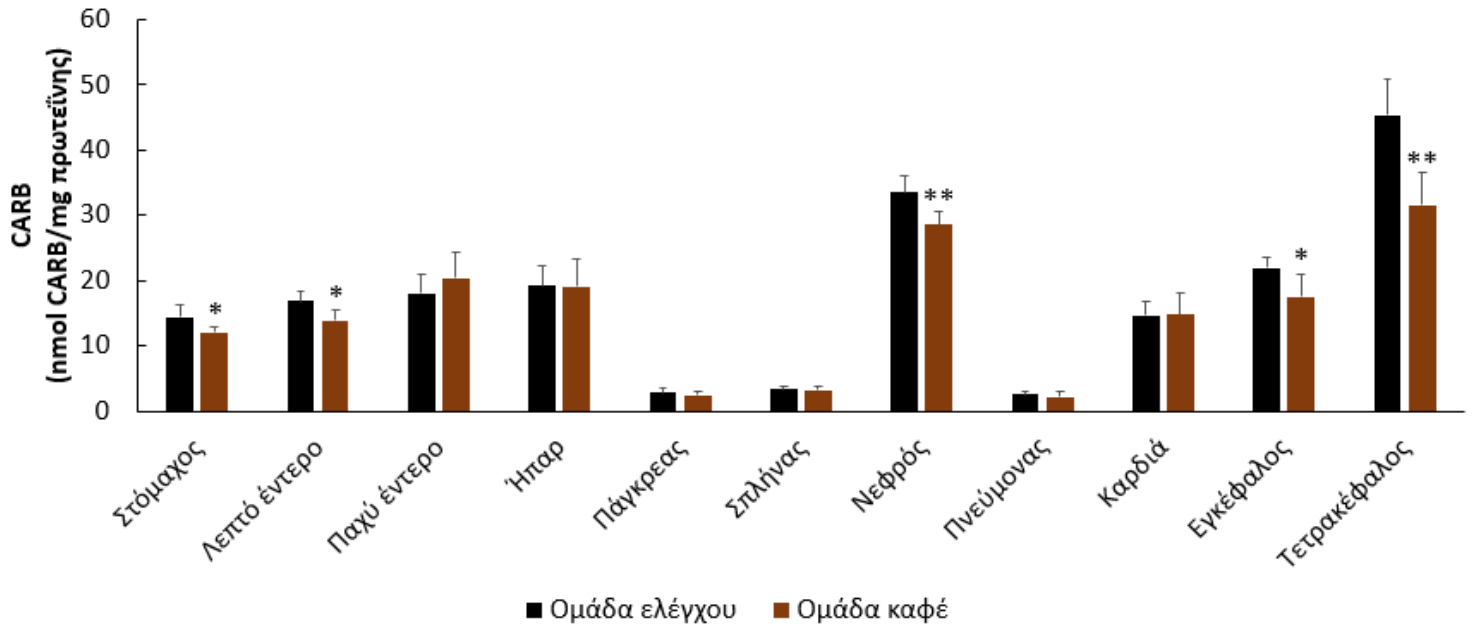
4.2.2.4 Λιπιδική υπεροξείδωση (TBARS)



Διάγραμμα 34: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξείδωσης σε ιστούς επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). TBARS: Ουσίες που Αλληλεπιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ

Η κατανάλωση καφέ μείωσε τα επίπεδα οξείδωσης των λιπιδίων σε 5 από τους 11 εξεταζόμενους ιστούς (Διάγραμμα 34). Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε μείωση στο ήπαρ κατά 26,7%, στον νεφρό κατά 27,9%, στον πνεύμονα κατά 30,5%, στον εγκέφαλο κατά 34,8% και στον τετρακέφαλο κατά 60,4%.

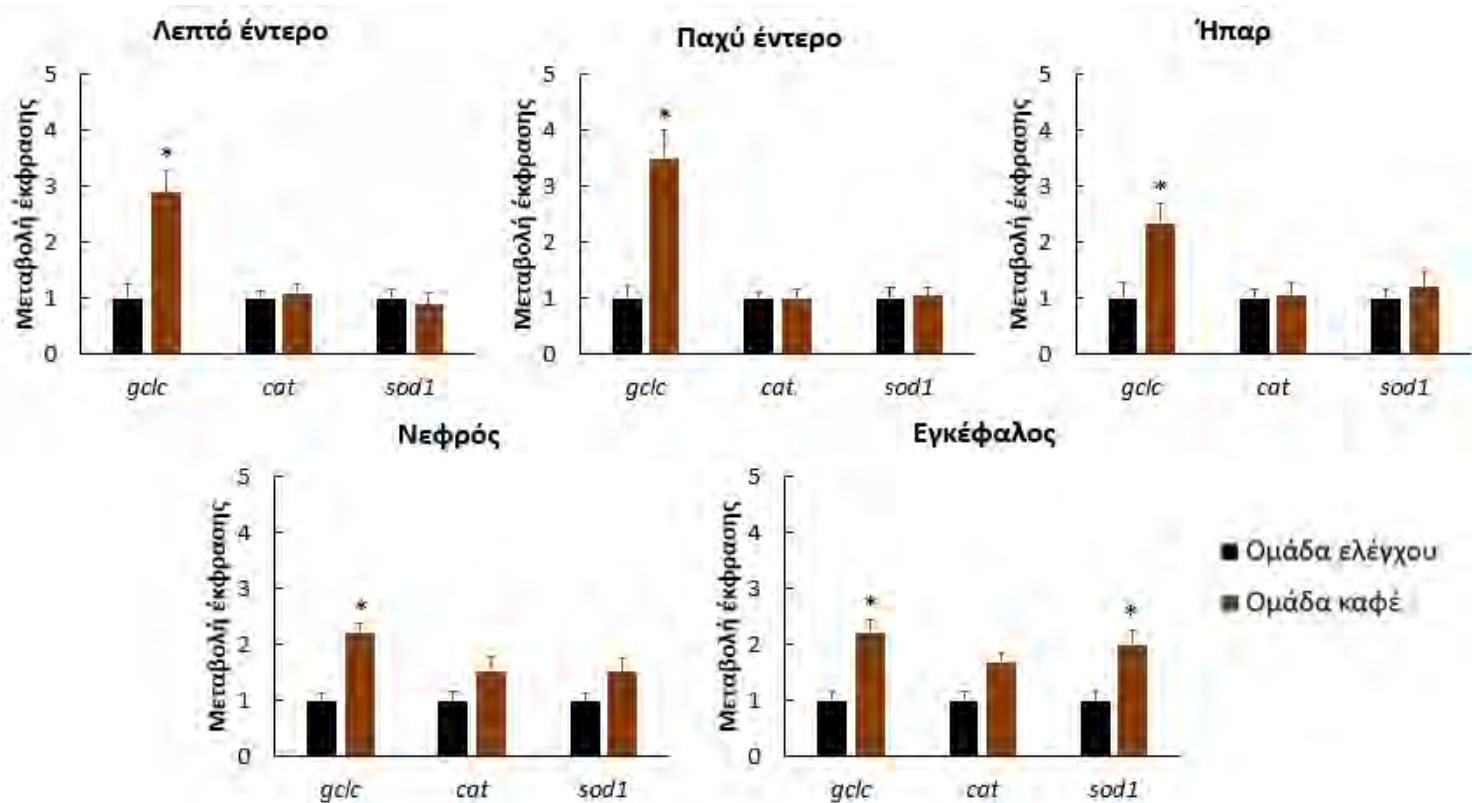
4.2.2.5 Πρωτεϊνική οξείδωση (CARB)



Διάγραμμα 35: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα πρωτεϊνικής οξείδωσης σε ιστούς επιμύων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). CARB: Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Στο Διάγραμμα 35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στον στόμαχο κατά 16,1%, στο λεπτό έντερο κατά 18,4%, στον νεφρό όπου μειώθηκε η οξείδωση κατά 14,8%, στον εγκέφαλο κατά 20,2% και στον τετρακέφαλο κατά 30,5%.

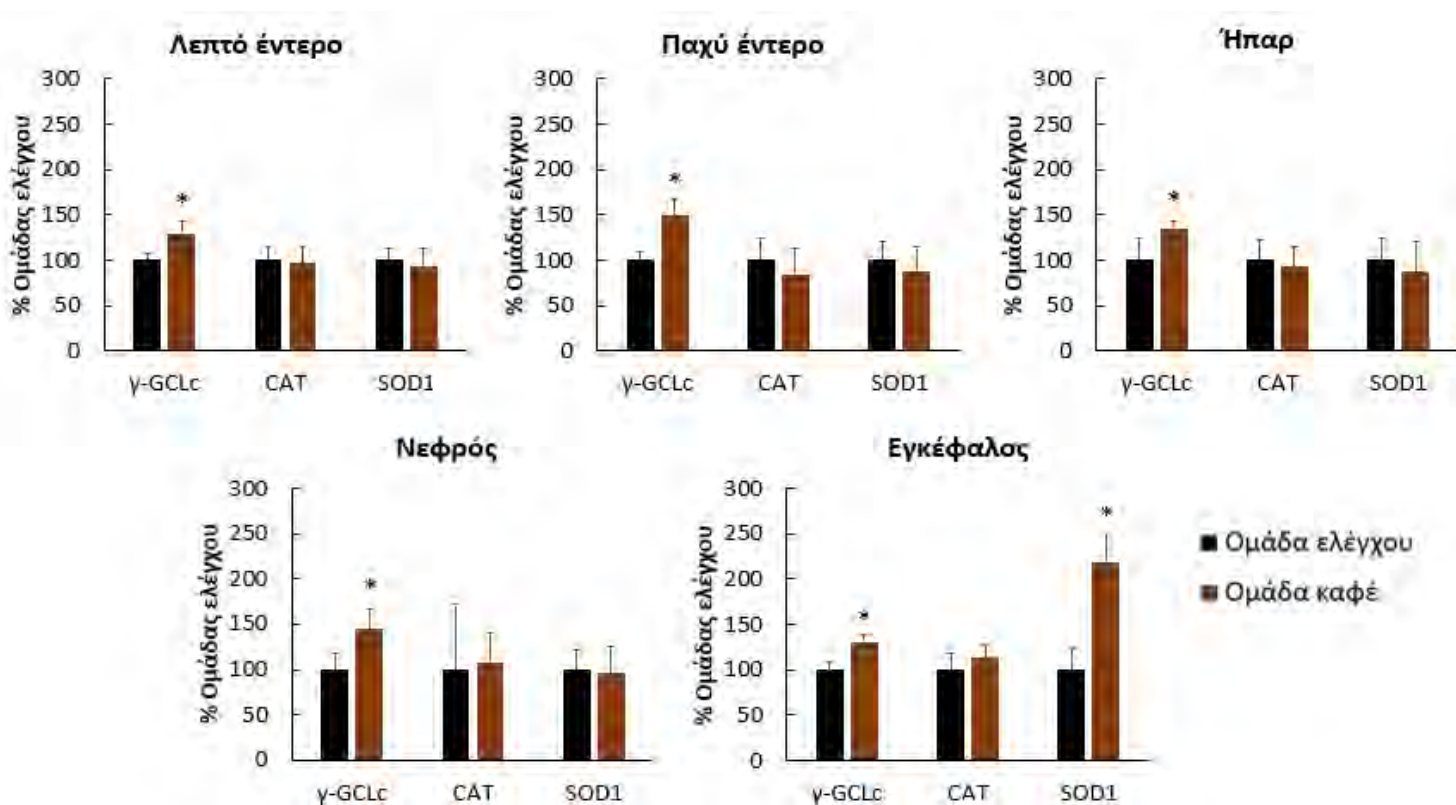
4.2.3 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης



Διάγραμμα 36: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα σε ιστούς επιμύων. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της ομάδας ελέγχου ενώ ως μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*).

Στην Real-Time PCR εξετάστηκαν οι 5 από τους 11 ιστούς και συγκεκριμένα το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, το ήπαρ, ο νεφρός και ο εγκέφαλος, όπως και στη μέθοδο Western-blot για την έκφραση των πρωτεϊνών. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο γονίδιο της γ -GCL (*gclc*), του οποίου η έκφραση αυξήθηκε από τον καφέ κατά 2,3 φορές στο ήπαρ, 2,9 φορές στο λεπτό έντερο, 3,5 φορές στο παχύ έντερο και 2,2 φορές στον νεφρό και τον εγκέφαλο. Ακόμα, στον εγκέφαλο αυξήθηκαν και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *sod1* κατά 2 φορές (Διάγραμμα 36).

4.2.4 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών



Διάγραμμα 37: Η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα σε ιστούς επιμύων. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της ομάδας ελέγχου ενώ ως μόριο κανονικοποίησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δυο ομάδων υποδηλώνονται με αστερίσκο (*).

Στο Διάγραμμα 37 παρατίθενται τα επίπεδα των πρωτεϊνών γ - GCL, CAT και SOD1 στους 5 ιστούς που μελετήθηκαν. Η στατιστικά σημαντική διαφορά, αφορά τα επίπεδα έκφρασης την γ -GCL σε νεφρό και εγκέφαλο και τα επίπεδα έκφρασης της SOD1 στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή (γ -GCL) αυξήθηκε κατά 35% στο ήπαρ, 29% στο λεπτό έντερο, 50% στο παχύ έντερο, 45% στο νεφρό και κατά 31% στον εγκέφαλο, ενώ τα επίπεδα της SOD1 αυξήθηκαν κατά 119% στον εγκέφαλο. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με τα ευρήματα της Real-Time PCR για τα επίπεδα mRNA.

4.3 Συζήτηση

Το τρίτο και τελευταίο τμήμα της παρούσας διατριβής εξέτασε την επίδραση ενός εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση 11 ιστών καθώς και του αίματος επίμυων. Το εκχύλισμα που χορηγήθηκε ήταν το ελαφρά καβουρδισμένο της ποικιλίας Brazil (R4) που εμφάνισε τη μεγαλύτερη δραστικότητα στα *in vitro* πειράματα. Το παρόν πείραμα αποσκοπούσε και στη διερεύνηση της πιθανότητας τα *in vitro* αποτελέσματα να συνάδουν με τα δεδομένα ενός *in vivo* πειράματος όπου μεσολαβούν η απορρόφηση, η κατανομή και ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών. Αυτή η μετάφραση των *in vitro* αποτελεσμάτων σε *in vivo* είναι ιδιάζουσα σημασίας για τις πολυφαινόλες, καθώς τα συγκεκριμένα μόρια χαρακτηρίζονται από χαμηλή απορροφητικότητα από τους οργανισμούς (262). Επιπρόσθετα, είναι συχνό φαινόμενο οι *in vitro* ιδιότητες φυτικών εκχυλισμάτων να μην παρατηρούνται και *in vivo* (263).

Το εκχύλισμα χορηγήθηκε 14 ημέρες σε αρσενικούς επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας 3 μηνών. Η δόση που χορηγήθηκε αντιστοιχούσε σε ημερήσια κατανάλωση 3-4 καφέδων από τον άνθρωπο και υπολογίστηκε τόσο βάση της βιβλιογραφίας, όσο και των προγενέστερων αποτελεσμάτων που έδειξαν ότι αυτή η δόση είχε τη βέλτιστη επίδραση στα κύτταρα (260). Έπειτα από το πέρας των δύο εβδομάδων συλλέχθηκε το αίμα και 11 ιστοί των επίμυων (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ, πάγκρεας, σπλήνας, νεφρός, πνεύμονας, καρδιά, εγκέφαλος και τετρακέφαλος) και πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις.

4.3.1 Επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των 5 βιοδεικτών που μετρήθηκαν, η κατανάλωση εκχυλίσματος καφέ για δύο εβδομάδες βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση τόσο στο αίμα όσο και σε όλους τους ιστούς των επίμυων. Αυτό αντικατοπτρίστηκε τόσο από τις αυξήσεις σε βιοδείκτες της αντιοξειδωτικής ικανότητας (GSH, αποικοδόμηση H₂O₂, TAC), όσο και από τη μείωση σε βιοδείκτες οξειδωτικών βλαβών σε λιπίδια και πρωτεΐνες (TBARS, CARB).

Αναλυτικότερα, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης αυξήθηκαν σε όλους τους ιστούς, πιθανότατα λόγω αυξημένου ρυθμού βιοσύνθεσης (όπως παρατηρήθηκε και στις κυτταρικές σειρές στο προηγούμενο κεφάλαιο) αλλά και στα ερυθροκύτταρα από 29,2 έως και 97,1% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αξιομνημόνευτο ήταν το γεγονός ότι ο ιστός με τη μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα GSH μεταξύ των δύο ομάδων ήταν ο εγκέφαλος. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστα και μάλιστα αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με την ικανότητα των

βιοδραστικών συστατικών του καφέ να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (264–266). Ωστόσο, τα παρόντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα συστατικά του καφέ επάγουν την αντιοξειδωτική άμυνα του εγκεφάλου. Η αύξηση της GSH από τον καφέ έχει παρατηρηθεί ξανά τόσο σε επίμυες όσο και σε ανθρώπους (189,260,267), παρ' όλα αυτά η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που μελέτησε τους ζωικούς ιστούς σε τόσο ευρεία κλίμακα. Η αύξηση της ανηγμένης γλουταθειόνης μπορεί να οφείλεται τόσο σε αυξημένο βιοσυνθετικό ρυθμό, όσο και σε αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης. Η βιοσύνθεση περιλαμβάνει δύο ένζυμα, την λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL) και τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) ενώ η ανακύκλωση την αναγωγή (GR) και την περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Όπως φάνηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο ο καφές μπορεί να επηρεάσει και τους δυο μηχανισμούς αν και κυρίως αυξάνεται η βιοσύνθεση μέσω της γ-GCL, κάτι που σχετίστηκε με την ικανότητα των χλωρογενικών οξέων κυρίως να ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Επομένως, πιθανότατα ο καφές προκάλεσε επαγωγή στα επίπεδα της γ-GCL τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης.

Ο δεύτερος βιοδείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκε (αποικοδόμηση H_2O_2), παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο σε δύο ιστούς, το παχύ έντερο και τον εγκέφαλο. Η αποικοδόμηση του υπεροξειδίου πραγματοποιείται κυρίως από αντιοξειδωτικά ένζυμα και ιδίως της καταλάσης (που εδράζει κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα) όσο και των περοξειρεδοξινών (κυτταροπλασματικές) (268). Επομένως, βλέπουμε ότι σε αντίθεση με τα *in vitro* αποτελέσματα (όπου ο καφές ανέστειλε τη δραστηριότητα της καταλάσης), στο *in vivo* σύστημα είτε δεν είχε κάποια επίδραση είτε προκάλεσε αύξηση της ικανότητας διάσπασης της συγκεκριμένης δραστικής μορφής οξυγόνου.

Όσον αφορά την TAC, επηρεάστηκε ελαφρώς καθώς μόνο σε 3 ιστούς παρατηρήθηκε αύξησή της (παχύ έντερο, νεφρός, εγκέφαλος). Ο συνδυασμός των ανωτέρω δεδομένων υποστηρίζει την υπόθεση ότι η κατανάλωση καφέ έχει ευεργετικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ιστών υποδηλώνουν την ύπαρξη ιστο-ειδικής δράσης του καφέ υποστηρίζοντας τα δεδομένα των *in vitro* κυτταροκαλλιιεργειών. Επομένως, υπογραμμίζεται η σημασία της αποτίμησης διαφορετικών δεικτών, ώστε να εξετάζεται σε μεγαλύτερο βάθος ο μηχανισμός δράσης ενός εκχυλίσματος (269,270).

Όσον αφορά τους δύο δείκτες οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, η κατανάλωση καφέ είχε ευεργετική επίδραση καθώς τους μείωσε σε αρκετούς ιστούς. Μόνο σε 3 ιστούς μειώθηκαν τα CARB και τα TBARS (νεφρός, εγκέφαλος και τετρακέφαλος) ταυτόχρονα.

Επομένως, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση η ιστο-ειδική επίδραση, ενώ φαίνεται και η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των βιοδραστικών συστατικών του καφέ με τους επιμέρους ιστούς. Η αύξηση της GSH θα μπορούσε να δικαιολογήσει τις μειωμένες οξειδώσεις, ωστόσο παρατηρούνται διαφορές πιθανώς λόγω διαφορετικής κατανομής ανά ιστό. Παρατηρήθηκε κάτι αξιοσημείωτο στο γαστρεντερικό σύστημα (στόμαχος, λεπτό και παχύ έντερο) όπου είναι γνωστό πως τα χλωρογενικά οξέα συσσωρεύονται στο παχύ έντερο (20). Αναλυτικότερα, στον στόμαχο και το λεπτό έντερο όπου η συγκέντρωση των CGA είναι θεωρητικά μικρότερη, εντοπίστηκε προστατευτική δράση στην ομάδα που κατανάλωσε το εκχύλισμα έναντι της οξειδωσης πρωτεϊνών, ωστόσο αυτό δεν παρουσιάστηκε στο παχύ έντερο που θεωρητικά συσσωρεύονται. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην προοξειδωτική επίδραση των πολυφαινόλων λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής τους και χρήζει περαιτέρω έρευνας για επιβεβαίωση της ανωτέρω υπόθεσης. Η απορρόφηση από το γαστρεντερικό σύστημα οδηγεί τα συστατικά του καφέ στο ήπαρ όπου και λαμβάνει χώρα το πρώτο στάδιο μεταβολισμού τους. Αυτό φαίνεται ότι επιδρά στη δραστηριότητα καθώς στο ήπαρ παρατηρήθηκε προστασία μόνο των λιπιδίων και όχι των πρωτεϊνών.

Εκτός των ιστών, μελετήθηκε και η επίδραση του εκχυλίσματος καφέ στο αίμα. Παρατηρήθηκε βελτίωση τόσο στα επίπεδα γλουταθειόνης όσο και στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 . Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν περιέχουν πυρήνα κι έτσι η επαγωγή έκφρασης γονιδίων δεν μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματα. Ωστόσο, καθώς τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα έχουν ενεργό πυρήνα, είναι πιθανό τα μόρια του καφέ να επηρέασαν την έκφραση γονιδίων σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, εξηγώντας έτσι τις παρατηρούμενες διαφορές.

4.3.2 Επίδραση του καφέ στην έκφραση γονιδίων και αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι ο καφές επηρεάζει τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων της, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της γ -GCL τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Επιπλέον, αποτιμήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης, δύο από τα σημαντικότερα ένζυμα που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση της ρίζας σουπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Από τους 11 ιστούς που μελετήθηκαν, επιλέχθηκαν οι 5 όπου ο καφές είχε την ισχυρότερη επίδραση, δηλαδή το γαστρεντερολογικό σύστημα (λεπτό και παχύ έντερο), τα κύρια μεταβολικά όργανα (ήπαρ, νεφρός) και ο εγκέφαλος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έκφραση της γ -GCL αυξήθηκε τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης και στους 5 ιστούς, επιβεβαιώνοντας έτσι την υπόθεση πως ο καφές επάγει τη βιοσύνθεση του αντιοξειδωτικού

τριπεπτιδίου. Από την άλλη, τα επίπεδα της καταλάσης δεν επηρεάστηκαν ενώ αυτά της υπεροξειδικής δισμουτάσης αυξήθηκαν μόνο στην εγκέφαλο, ούσα και η μόνη διαφορά μεταξύ των ιστών. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα *in vitro* του προηγούμενου κεφαλαίου. Συνολικά, η αύξηση της GSH δικαιολογείται από τον αυξημένο ρυθμό βιοσύνθεσης λόγω αύξησης των επιπέδων του καθοριστικού ενζύμου του μονοπατιού βιοσύνθεσης της. Ακόμα, η αύξηση της SOD1 στον εγκέφαλο υποστηρίζει την παρατήρηση ότι ο καφές ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα του εγκεφάλου (271).

Τα αποτελέσματα από αυτό το πείραμα έρχονται σε συμφωνία με πληθώρα μελετών της βιβλιογραφίας σύμφωνα με τις οποίες η μέτρια κατανάλωση καφέ έχει ευεργετικά αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, μια μελέτη σε επίμυες έδειξε προστατευτική επίδραση ως προς την οξειδωση λιπιδίων του εγκεφάλου, ενώ αυξήθηκε και η GSH καθώς και τα επίπεδα των GR και SOD1 (232). Σε μια άλλη μελέτη η κατανάλωση καφέ οδήγησε στην επαγωγή των GSTs λόγω ενεργοποίησης του Nrf2 στο ήπαρ επίμυων (272), ενώ σε μια τρίτη μελέτη παρουσιάστηκε επαγωγή της UGT στο ήπαρ και τον στόμαχο ποντικών (205).

Ταυτόχρονα, έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά μελετών του εργαστηρίου μας σχετικά με την επίδραση των φυτοχημικών (όπως τα παραπροϊόντα οινοποίησης και παρασκευής ελαιόλαδου) στην υγεία των ζωικών οργανισμών (273–276).

4.3.3 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, η παρούσα διατριβή εξέτασε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του καφέ υπό τη μορφή εκχυλίσματος πράσινων ή καβουρδισμένων κόκκων, προσφέροντας ένα σύνολο δοκιμασιών μέσω των οποίων μπορεί να χαρακτηριστεί η δραστηριότητα ενός εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα άνωθεν αποτελέσματα, όλα τα εξετασθέντα δείγματα παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές αναλόγως της προέλευσης και του είδους του καφέ. Οι ιδιότητες αυτές συσχετίστηκαν ισχυρά με το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων και ειδικότερα της κύριας πολυφαινολικής ομάδας που συναντάται στον καφέ, τα χλωρογενικά οξέα. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση κυτταρικών σειρών. Η χορήγηση των εκχυλισμάτων είχε ευεργετική επίδραση ενώ χρήζει αναφοράς η παρατηρούμενη επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν για κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση από τη χορήγηση των εκχυλισμάτων στα κύτταρα αφορούσε τον πολύπλοκο τρόπο επίδρασης του καφέ αναλόγως της χορηγούμενης συγκέντρωσης. Επιπρόσθετα, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή

αντιμεταλλαξιγόνο δραστηριότητα. Ο συνδυασμός αυτών των *in vitro* αποτελεσμάτων οδήγησε στην πραγματοποίηση του *in vivo* πειράματος στο οποίο χορηγήθηκε το δραστηκότερο εκχυλίσμα σε δόση που είχε την ισχυρότερη επίδραση όντας ταυτόχρονα εντός των φυσιολογικών ορίων κατανάλωσης.

Η χορήγηση εκχυλίσματος καφέ οδήγησε σε εμφανή βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε όλους τους ιστούς και το αίμα των επιμύων, κυρίως ως προς τα επίπεδα της GSH, του σημαντικότερου ενδοκυτταρικού μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού. Η επαγωγή της βιοσύνθεσής της φαντάζει ως ο κύριος μηχανισμός στον οποίο μπορεί να αποδοθεί αυτή η αύξηση. Συνολικά, τα αποτελέσματα του *in vivo* πειράματος επιβεβαίωσαν τις περισσότερες παρατηρήσεις όλων των *in vitro*, ενώ με εξαίρεση τη γλουταθειόνη, η επίδραση του καφέ φάνηκε να είναι ιστο-ειδική τονίζοντας την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης ενός σύνθετου μίγματος βιοδραστικών ενώσεων όπως είναι το ρόφημα του καφέ με το σύνολο των ιστών ενός οργανισμού. Συμπεριλαμβανομένων και των μειώσεων που παρατηρήθηκαν στην οξείδωση μακρομορίων, προκύπτει ότι η μέτρια κατανάλωση καφέ προσφέρει πληθώρα αντιοξειδωτικών μορίων στον οργανισμό και βελτιώνει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς μέσω και της επαγωγής των ενδογενών ενζύμων. Παραμένουν αρκετά ερωτηματικά σχετικά με την αλληλεπίδραση των μορίων του καφέ με το σύνολο των ιστών ενός οργανισμού, ωστόσο η παρούσα εργασία προσέφερε αρκετά δεδομένα, ενισχύοντας την άποψη ότι ο καφές βελτιώνει της οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού σε κατάλληλη δόση και κατ' επέκταση μπορεί να θεωρηθεί ως ένα βιολειτουργικό ρόφημα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Βιβλιογραφία

1. Dirks-Naylor AJ. The benefits of coffee on skeletal muscle. *Life Sci* [Internet]. 2015 Dec 15;143:182–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320515300680>
2. Rodrigues NP, Salva TDJG, Bragagnolo N. Influence of coffee genotype on bioactive compounds and the in vitro capacity to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *J Agric Food Chem*. 2015 May;63(19):4815–26.
3. Maurin O, Davis AP, Chester M, Mvungi EF, Jaufeerally-Fakim Y, Fay MF. Towards a Phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Ann Bot*. 2007 Dec;100(7):1565–83.
4. Ramalakshmi K, Raghavan B. Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How? *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 1999 Jul 1;39(5):441–56. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408699991279231>
5. Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJJ, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct* [Internet]. 2014;5(8):1695–717. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4FO00042K>
6. Akash MSH, Rehman K, Chen S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* [Internet]. 2014 Jul;30(7–8):755–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713005480>
7. Bøhn SK, Blomhoff R, Paur I. Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(5):915–30.
8. Farah A, de Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem*. 2006 Jan;54(2):374–81.
9. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta*. 2000 May;295(1–2):141–54.

10. Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004 Jan;140(1):1–8.
11. Agardh EE, Carlsson S, Ahlbom A, Efendic S, Grill V, Hammar N, et al. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *J Intern Med.* 2004 Jun;255(6):645–52.
12. Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB, et al. Risk factors for Alzheimer’s disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol.* 2002 Sep;156(5):445–53.
13. Larsson SC, Wolk A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2007 May;132(5):1740–5.
14. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr.* 2003 Oct;78(4):728–33.
15. Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaria L, Garcia-Hernandez B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine.* 2004 Nov;11(7–8):561–6.
16. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 2003 Sep;133(9):2812–9.
17. Farah A, Monteiro MC, Calado V, Franca AS, Trugo LC. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.* 2006;98(2):373–80.
18. Xu J-GG, Hu Q-PP, Liu Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2012 Nov 21;60(46):11625–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23134416>
19. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM LS. 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J Nutr.* 2008;(September):2309–15.

20. Vitaglione P, Fogliano V, Pellegrini N. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food Funct.* 2012;3(9):916.
21. Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozier A. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients.* 2010 Aug;2(8):820–33.
22. Wattenberg L. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer research.* 1983 May;43(5 Suppl):2448s–2453s.
23. Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, Constable A, Huber W, Schilter B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2002 Aug;40(8):1155–63.
24. Olthof M, Hollman P, Zock P, Katan M. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition.* 2001 Mar;73(3):532–8.
25. Pérez-Hernández LM, Chávez-Quiroz K, Medina-Juárez LÁ, Gámez Meza N. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *J Mex Chem Soc.* 2012;56(4):430–5.
26. Moreira ASP, Nunes FM, Domingues MR, Coimbra MA. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Funct* [Internet]. 2012;3(9):903–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C2FO30048F>
27. Coelho C, Ribeiro M, Cruz ACS, Domingues MRM, Coimbra MA, Bunzel M, et al. Nature of phenolic compounds in coffee melanoidins. *J Agric Food Chem.* 2014 Aug;62(31):7843–53.
28. Perrone D, Farah A, Donangelo CM. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *J Agric Food Chem.* 2012 May;60(17):4265–75.
29. O’Keefe JH, DiNicolantonio JJ, Lavie CJ. Coffee for Cardioprotection and Longevity. *Prog Cardiovasc Dis.* 2018 Feb;

30. Baspinar B, Eskici G, Ozcelik AO. How coffee affects metabolic syndrome and its components. *Food Funct.* 2017 Jun;8(6):2089–101.
31. Chrysant SG. The impact of coffee consumption on blood pressure, cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2017 Mar;15(3):151–6.
32. Chu Y-F, Chen Y, Black RM, Brown PH, Lyle BJ, Liu RH, et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF-κB inhibition, and stimulation of glucose uptake. *Food Chem* [Internet]. 2011 Feb [cited 2015 Jan 5];124(3):914–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610008587>
33. Grosso G, Godos J, Galvano F, Giovannucci EL. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2017;37(1):131–56. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071816-064941>
34. Alicandro G, Tavani A, La Vecchia C. Coffee and cancer risk: a summary overview. *Eur J Cancer Prev.* 2017 Sep;26(5):424–32.
35. Monente C, Bravo J, Vitas AI, Arbillaga L, De Peña MP, Cid C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *J Funct Foods.* 2015;12:365–74.
36. Friederich U, Hann D, Albertini S, Schlatter C, Würigler FE. Mutagenicity studies on coffee. *Mutat Res Toxicol* [Internet]. 1985;156(1):39–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165121885900059>
37. Blair CA, Shibamoto T. Ames mutagenicity tests of overheated brewed coffee. *Food Chem Toxicol.* 1984 Dec;22(12):971–5.
38. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989 Dec;82(12):747–52.
39. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 1999;13(3):295–309.
40. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988

- Mar;5(3):156–70.
41. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Mar;33(3):368–70.
 42. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA; 2015.
 43. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* [Internet]. 2002 Oct;18(10):872–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>
 44. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994 Aug;52(8 Pt 1):253–65.
 45. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3):481–93.
 46. Steinbacher P, Eckl P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules.* 2015;5(2):356–77.
 47. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Mar;4(8):118–26.
 48. von Sonntag C. The Chemistry of Free-Radical-Mediated DNA Damage. In: Glass W, Varma M, editors. *Physical and Chemical Mechanisms in Molecular Radiation Biology SE - 10.* Springer US; 1991. p. 287–321. (Basic Life Sciences; vol. 58).
 49. Bielski BJ, Cabelli D. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. In: Foote C, Valentine J, Greenberg A, Liebman J, editors. *Active Oxygen in Chemistry SE - 3.* Springer Netherlands; 1995. p. 66–104. (Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (SEARCH Series); vol. 2).
 50. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jan;30(1):11–26.
 51. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527–605.

52. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem*. 1989 Jun;264(17):9880–4.
53. Choi E-Y, Stockert AL, Leimkühler S, Hille R, Choi E-Y, Stockert AL, et al. Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J Inorg Biochem*. 2004;98:841–8.
54. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. Vol. 275, *FEBS Journal*. 2008. p. 3278–89.
55. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium: Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem*. 1999;274(8):4985–94.
56. Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol*. 2008 Aug;130(2):281–97.
57. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2006.
58. Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med*. 1998;
59. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* [Internet]. 2014;24(10):R453–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
60. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2016 Mar;148:183–93.
61. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2013 Jan;12(1):376–90. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163712001468>
62. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol*. 2013;231:290–300.

63. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 Jan 12];16(2):217–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24522549>
64. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med*. 2018 Aug;124:420–30.
65. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jul;33(1):29–36.
66. Renke J, Popadiuk S, Korzon M, Bugajczyk B, Wozniak M. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jul;29(2):101–4.
67. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 May;32(9):790–6.
68. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: eLS [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3>
69. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun;86:715–48.
70. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*. 2015.
71. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006 Mar;160(1):1–40.
72. SIES H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 1993.
73. Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med*. 2015;
74. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 May;11(4):341–6.
75. Sea K, Sohn SH, Durazo A, Sheng Y, Shaw BF, Cao X, et al. Insights into the role of the

- unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2015;290(4):2405–18.
76. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 2000;296(1):295–309.
 77. Holmgren A. Electron Transport to Reductive Enzymes. *Biochemistry.* 1989;264(24):13963–6.
 78. Elias S. J. ArneÂr and Arne Holmgren. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000;6109:6102–9.
 79. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec;31(11):1287–312.
 80. Collet J-F, Messens J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(8):1205–16.
 81. Karlenius TC, Tonissen KF. Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. *Cancers (Basel).* 2010;2(2):209–32.
 82. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):558–67.
 83. Morse D, Choi AMK. Heme oxygenase-1: From bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(6):660–70.
 84. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev.* 2006;86:583–650.
 85. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol.* 2012;2(December):1–13.
 86. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013;
 87. Suzuki M, Otsuki A, Keleku-Lukwete N, Yamamoto M. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr Opin Toxicol.* 2016;1:29–36.

88. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76–86.
89. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013.
90. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2015 Nov;88(Pt B):108–46.
91. McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, et al. Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr.* 2004 Dec;134(12 Suppl):3499S–3506S.
92. Atia A, Alrawaiq N, Abdullah A. A review of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1); A multifunctional antioxidant enzyme. *J Appl Pharm Sci.* 2014;4(12):118–22.
93. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta.* 2005;352(1–2):37–47.
94. Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Breckwoldt D, Schrader C, Schmelzer C, Döring F, et al. Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2. *BMC Complement Altern Med.* 2011;
95. Martini D, Del Bo C, Porrini M, Ciappellano S, Riso P. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2017.
96. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3217–66.
97. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From

- Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957–97.
98. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45(1):51–88.
 99. Josephy PD. Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology. *Hum Genomics Proteomics*. 2010;2010:1–14.
 100. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev*. 2011;43(2):138–51.
 101. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):86–98.
 102. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;
 103. Buettner GR. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993.
 104. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004 Mar;134(3):489–92.
 105. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. Vol. 5 AUG, *Frontiers in Pharmacology*. 2014.
 106. Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology*. 2016.
 107. Kumar AN. Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant \blacklozenge an uncertainty. Aruna P, editor. *Arch Med Rev J [Internet]*. 2015;24(1):19–40. Available from: <http://www.scopemed.org/?mno=162974>
 108. Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal*. 2004;
 109. Lattanzio VMTV, Lattanzio VMTV, Cardinali A, Amendola V. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Vol. 661, *Phytochemistry*. 2006. 23-67 p.

110. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*. 2015.
111. Crozier A, Clifford MN. Terpenes, Plant Secondary Metabolites. *Plant Secondary Metabolites Occurrence , Structure and Role in the Human Diet*. 2006.
112. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002.
113. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1231–46.
114. Landete JM. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(7):706–21.
115. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270–8.
116. Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(10):936–48.
117. Galinski CN, Zwicker JJ, Kennedy DR. Revisiting the mechanistic basis of the French Paradox: Red wine inhibits the activity of protein disulfide isomerase in vitro. *Thromb Res*. 2016;
118. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001.
119. Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian J Plant Physiol* [Internet]. 2006;18(1):23–36. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202006000100003&nrm=iso
120. Esquivel P, Jiménez VM. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res Int* [Internet]. 2012 May;46(2):488–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911003449>

121. Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, et al. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J Nutr Biochem*. 2011 May;22(5):426–40.
122. Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*. 2015;8(1):1–20.
123. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2015.
124. Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. Dietary lignans: Physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*. 2010;
125. Sies H. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010.
126. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2008 Aug 15;476(2):107–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986108000489>
127. Visioli F. Xenobiotics and human health: A new view of their pharma-nutritional role. *PharmaNutrition*. 2015;3(2):60–4.
128. Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 2011.
129. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2010 Sep 1;501(1):65–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986110002328>
130. Barrajon-Catalan E, Herranz-Lopez M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menendez JA, et al. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: Far beyond their antioxidant properties. Vol. 824, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014. p. 141–59.
131. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, Lamuela-Raventós RM, Singleton L.

- V, Orthofer R, et al. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Enzymology LPBT-M* in, editor. *Oxidants and Antioxidants Part A* [Internet]. Academic Press; 1999. p. 152–78. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>
132. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 1995;28(1):25–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>
 133. Cano A, Hernández-Ruíz J, García-Cánovas F, Acosta M, Arnao MB. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* [Internet]. 1998 Jul 1;9(4):196–202. Available from: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199807/08\)9:4%3C196::AID-PCA395%3E3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199807/08)9:4%3C196::AID-PCA395%3E3.0.CO)
 134. Yen GC, Pin-Der D, Duht P, Species A, Yen GC, Duht P, et al. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1994 Mar 1;42(3):629–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00039a005>
 135. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem*. 2001 Jul;49(7):3420–4.
 136. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, et al. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett*. 2000 Mar;150(1):41–8.
 137. Knasmuller S, Nersesyanyan A, Misik M, Gerner C, Mikulits W, Ehrlich V, et al. Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *Br J Nutr*. 2008 May;99 E Suppl:ES3-52.
 138. Tajik N, Tajik M, Mack I, Enck P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr*. 2017 Oct;56(7):2215–44.
 139. Nieber K. The Impact of Coffee on Health. *Planta Med*. 2017 Nov;83(16):1256–63.

140. Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*. 2017 Nov;359:j5024.
141. Shimamoto T, Yamamichi N, Kodashima S, Takahashi Y, Fujishiro M, Oka M, et al. No Association of Coffee Consumption with Gastric Ulcer, Duodenal Ulcer, Reflux Esophagitis, and Non-Erosive Reflux Disease: A Cross-Sectional Study of 8,013 Healthy Subjects in Japan. *PLoS One*. 2013;
142. Veskoukis AS, Kerasioti E, Priftis A, Kouka P, Spanidis Y, Makri S, et al. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: the biomarker issue. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2018; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468202018300378>
143. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011 Jan;50(3):586–621.
144. Richelle M, Tavazzi I, Offord E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem*. 2001 Jul;49(7):3438–42.
145. Gawlik-Dziki U, Świeca M, Dziki D, Kowalska I, Pecio Ł, Durak A, et al. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee—mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Res Int* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Jan 10];61:48–55. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691400307X>
146. Perrone D, Donangelo R, Donangelo CM, Farah A. Modeling weight loss and chlorogenic acids content in coffee during roasting. *J Agric Food Chem*. 2010;58(23):12238–43.
147. Smrke S, Opitz SEW, Vovk I, Yeretzyan C. How does roasting affect the antioxidants of a coffee brew? Exploring the antioxidant capacity of coffee via on-line antioxidant assays coupled with size exclusion chromatography. *Food Funct*. 2013 Jul;4(7):1082–92.
148. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity

- from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2006 Sep;19(6–7):669–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157506000081>
149. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 Apr 26;53(10):4290–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0502698>
 150. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Vol. 53, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. p. 1841–56.
 151. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon J-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem*. 2009 Mar;57(5):1768–74.
 152. Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, et al. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:60–8.
 153. Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* [Internet]. 2007;102(3):938–53. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460600522X>
 154. Nicoli MC, Anese M, Manzocco L, Lericri CR. Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 1997 May;30(3):292–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896901814>
 155. Odzakovic B, Dzinic N, Kukric Z, Grujic S. Effect of roasting degree on the antioxidant activity of different Arabica coffee quality classes. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2016;15(4):409–17.
 156. Chanda S, Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African J Microbiol Res*. 2009;
 157. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 1988 Apr;240(4852):640–2.

158. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;
159. Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, et al. Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Res.* 2007;27(5 A):3403–10.
160. Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, et al. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol.* 2012 Nov;50(11):4115–24.
161. Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, et al. Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *J Agric Food Chem.* 2008 Aug;56(16):6967–76.
162. Kouka P, Priftis A, Stagos D, Angelis A, Stathopoulos P, Xinos N, et al. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med.* 2017;40(3).
163. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 1999.
164. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003.
165. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;
166. Emeis JJ, Edgell CJ. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood.* 1988;
167. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2001 May;28(2):141–3.
168. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA.

- Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*. 2004 Mar;357(2):83–6.
169. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003;3:18.
 170. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6(4):279–84.
 171. Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükkökuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2014 Dec 23];90(2–3):205–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013182>
 172. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 1987;
 173. Veskoukis AS, Kouretas D, Panoutsopoulos GI. Substrate specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase for methyl- and nitrobenzaldehydes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;
 174. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C):121–6.
 175. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2000 Nov 20;455(1–2):29–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510700000646>
 176. Hix S, Kadiiska MB, Mason RP, Augusto O. In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol*. 2000 Oct;13(10):1056–64.
 177. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jul;27(1–2):69–74.

178. Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev.* 2001;7:90–107.
179. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews.* 2008.
180. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* [Internet]. 2009;73(March):411–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19194043
181. Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Mijares AH-. Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2009;15:2988–3002. Available from: www.ebscohost.com
182. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003 Jul;333(1):19–39.
183. Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Jul;3(4):228–37.
184. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* [Internet]. 2002 Aug 1;177(1):67–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02001968>
185. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* [Internet]. 2011 Jun;82(4):513–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11000396>
186. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Jan;51(0):15–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512006941>
187. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress,

- prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jan 12];2014:761264. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3920909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
188. Scharf G, Prustomersky S, Knasmüller S, Schulte-Hermann R, Huber WW. Enhancement of glutathione and γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer*. 2003;
 189. Huber WW, Scharf G, Rossmannith W, Prustomersky S, Grasl-Kraupp B, Peter B, et al. The coffee components kahweol and cafestol induce γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. *Arch Toxicol*. 2002;
 190. Goya L, Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Bravo L, Morales FJ. Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by *tert*-butylhydroperoxide. *Mol Nutr Food Res*. 2007;
 191. Bedoya-Ramirez D, Cilla A, Contreras-Calderon J, Alegria-Toran A. Evaluation of the antioxidant capacity, furan compounds and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of commercial Colombian coffee. *Food Chem*. 2017 Mar;219:364–72.
 192. Sirota R, Gorelik S, Harris R, Kohen R, Kanner J. Coffee polyphenols protect human plasma from postprandial carbonyl modifications. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Apr 26];57(5):916–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201200557>
 193. Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, et al. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 2014 Nov;33(11):1099–112.
 194. Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, et al. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5846–56.
 195. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract

- are highly bioavailable in humans. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2309–15.
196. Hoelzl C, Knasmüller S, Wagner KH, Elbling L, Huber W, Kager N, et al. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(12):1722–33.
 197. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. In: *Biochemistry (Moscow)*. 2004. p. 70–4.
 198. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.
 199. Dourado DFAR, Fernandes PA, Ramos MJ. Glutathione Transferase Classes Alpha, Pi, and Mu: GSH Activation Mechanism. *J Phys Chem B [Internet]*. 2010 Oct 14;114(40):12972–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jp1053875>
 200. Higgins LG, Cavin C, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol [Internet]*. 2008 Feb 1;226(3):328–37. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X07004243>
 201. Volz N, Boettler U, Winkler S, Teller N, Schwarz C, Bakuradze T, et al. Effect of coffee combining green coffee bean constituents with typical roasting products on the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*. 2012 Sep;60(38):9631–41.
 202. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Sep;501(1):116–23.
 203. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician’s Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7857186.
 204. Kim J, Lee S, Shim J, Kim HW, Kim J, Jang YJ, et al. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and

- prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochem Int* [Internet]. 2012 Apr;60(5):466–74. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018612000551>
205. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Coffee Induces Expression of Glucuronosyltransferases by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Nrf2 in Liver and Stomach. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 Nov;139(5):1699–1710.e2. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508510009571>
 206. Wang J, Wang H, Peng Y, Wang G-J, Hao H-P. Isochlorogenic acid A affects P450 and UGT enzymes in vitro and in vivo. *Chin J Nat Med*. 2016 Nov;14(11):865–70.
 207. Ishikawa T, Takahashi S, Morita K, Okinaga H, Teramoto T. Induction of AhR-mediated gene transcription by coffee. *PLoS One*. 2014;9(7):e102152.
 208. Watson WH, Pohl J, Montfort WR, Stuchlik O, Reed MS, Powis G, et al. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Aug 29 [cited 2017 Apr 26];278(35):33408–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816947>
 209. Ji L, Jiang P, Lu B, Sheng Y, Wang X, Wang Z. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2013 Nov;24(11):1911–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313001162>
 210. Lassen N, Pappa A, Black WJ, Jester J V, Day BJ, Min E, et al. Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2006 Nov;41(9):1459–69.
 211. Black W, Chen Y, Matsumoto A, Thompson DC, Lassen N, Pappa A, et al. Molecular mechanisms of ALDH3A1-mediated cellular protection against 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med*. 2012 May;52(9):1937–44.
 212. Ross MK, Crow JA. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(4):187–96.
 213. Williams AC, Ramsden DB. Nicotinamide homeostasis: A xenobiotic pathway that is key

- to development and degenerative diseases. *Med Hypotheses* [Internet]. 2005;65(2):353–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987705001106>
214. Pickering AM, Linder RA, Zhang H, Forman HJ, Davies KJA. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alpha regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2012 Mar;287(13):10021–31.
 215. Shen G, Kong A-N. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. *Biopharm Drug Dispos*. 2009 Oct;30(7):345–55.
 216. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem*. 2005 May;280(21):20340–8.
 217. Amoutzias GD, Robertson DL, Van de Peer Y, Oliver SG. Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem Sci*. 2008 May;33(5):220–9.
 218. Amoutzias GD, Bornberg-Bauer E, Oliver SG, Robertson DL. Reduction/oxidation-phosphorylation control of DNA binding in the bZIP dimerization network. *BMC Genomics*. 2006 May;7:107.
 219. Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V, et al. Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(5):798–802.
 220. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2011 Oct;44(2):192–201.
 221. Erlank H, Elmann A, Kohen R, Kanner J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic Biol Med*. 2011;
 222. Boettler U, Volz N, Teller N, Haupt LM, Bakuradze T, Eisenbrand G, et al. Induction of antioxidative Nrf2 gene transcription by coffee in humans: depending on genotype? *Mol*

- Biol Rep. 2012 Jun;39(6):7155–62.
223. Honda S, Miura Y, Masuda A, Masuda T. Identification of crypto- and neochlorogenic lactones as potent xanthine oxidase inhibitors in roasted coffee beans. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(12):2110–6.
224. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May;298(5):R1173-87.
225. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Feb;288(2):R345-53.
226. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo F V., Sastre J, Ji LL, Viña J, et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* [Internet]. 2005;567(Pt 1):113–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932896> <http://jp.physoc.org/content/567/1/113.full.pdf>
227. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab.* 2008 Dec;33(6):1140–54.
228. Day RO, Kamel B, Kannangara DRW, Williams KM, Graham GG. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clin Sci (Lond).* 2016 Dec;130(23):2167–80.
229. Prado De Oliveira E, Burini RC. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2012;4(1):12. Available from: <http://www.dmsjournal.com/content/4/1/12>
230. Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* [Internet]. 2002;9(2):195–217. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860355>
231. Magalhães CS De, Takarada JE, Carvalho NC, Carvalho DDC, De Andrade FL, Ferreira EB, et al. The Coffee Protective Effect on Catalase System in the Preneoplastic Induced Rat

- Liver. *J Chem.* 2016;2016.
232. Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(4):659–64.
 233. Friederich U, Hann D, Albertini S, Schlatter C, Wurgler FE. Mutagenicity studies on coffee. The influence of different factors on the mutagenic activity in the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat Res.* 1985;156(1–2):39–52.
 234. Aeschbacher HU, Chappuis C, Würzner HP. Mutagenicity testing of coffee: A study of problems encountered with the Ames Salmonella test system. *Food Cosmet Toxicol.* 1980;18(6):605–13.
 235. Lee KJ, Jeong HG. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. *Toxicol Lett* [Internet]. 2007 Sep 10;173(2):80–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427407007539>
 236. Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin PR. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J Agric Food Chem.* 2005;53(5):1505–13.
 237. Upadhyay R, Mohan Rao LJ. An Outlook on Chlorogenic Acids-Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Jan 10];53(9):968–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768188>
 238. Ali M, Homann T, Khalil M, Kruse H. Milk whey protein modification by coffee specific phenolics – Effect on structural and functional properties University of Potsdam , Institute of Nutritional Science , Arthur-Scheunert-Allee 114-116 ,.
 239. Garrett R, Schmidt EM, Pereira LFP, Kitzberger CSG, Scholz MBS, Eberlin MN, et al. Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *LWT - Food Sci Technol.* 2013 Mar;50(2):496–502.
 240. Ky C-L, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.

- accessions. *Food Chem* [Internet]. 2001 Nov;75(2):223–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814601002047>
241. Hečimović I, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem*. 2011;129(3):991–1000.
242. Tfouni SA V, Serrate CS, Carreiro LB, Camargo MCR, Teles CRA, Cipolli KMVAB, et al. Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two *Coffea* cultivars: *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and *Coffea canephora* cv. Apoaã IAC-2258. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2012;47(2):406–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02854.x>
243. Trugo LC, Macrae R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem*. 1984;15(3):219–27.
244. Jaiswal R, Matei MF, Golon A, Witt M, Kuhnert N. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. *Food Funct*. 2012 Sep;3(9):976–84.
245. Moeenfarid M, Rocha L, Alves A. Quantification of caffeoylquinic acids in coffee brews by HPLC-DAD. *J Anal Methods Chem*. 2014;2014.
246. Kremr D, Bajer T, Bajerová P, Surmová S, Ventura K. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review. Vol. 39, *Quimica Nova*. 2016. p. 530–3.
247. Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2015 Jan 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25542528>
248. Li Y, Shi W, Li Y, Zhou Y, Hu X, Song C, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008;26(1):13–21.
249. Park JB. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *J Nutr Biochem*. 2009;20(10):800–5.

250. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:801457.
251. Stalmach A, Williamson G, Crozier A. Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food Funct*. 2014;5:1727–37.
252. Ludwig IA, Paz de Pe??a M, Concepci??n C, Alan C. Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *BioFactors*. 2013;39(6):623–32.
253. Sinisi V, Forzato C, Cefarin N, Navarini L, Berti F. Interaction of chlorogenic acids and quinides from coffee with human serum albumin. *Food Chem*. 2015;168:332–40.
254. Priftis A, Panagiotou E-MEME-ME-M, Lakis K, Plika C, Halabalaki M, Ntasi G, et al. Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food Chem Toxicol*. 2018 Apr;114:119–27.
255. Priftis A, Mitsiou D, Halabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Skaltsounis LA, et al. Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2018 May;829–830:33–42.
256. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DADA, Tsatsakis AMAM, et al. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep*. 2015;12(5).
257. Priftis A, Goutzourelas N, Chalabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Amoutzias GDGDGD, et al. Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev*. 2017 Nov;
258. Priftis A, Papikinos K, Koukoulanaki M, Kerasioti E, Stagos D, Konstantinopoulos K, et al. Development of an assay to assess genotoxicity by particulate matter extract. *Mol Med Rep*. 2017 Apr;15(4):1738–46.
259. Priftis A, Angeli-Terzidou A-EA-E, Veskoukis ASAS, Spandidos DADADA, Kouretas D. Cellspecific and roastingdependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(6).
260. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoruso DC, Ribecco MT, Romano A, et al. Coffee

- reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*. 2010;52(5):1652–61.
261. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(3):231–6.
 262. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R, Vari R, et al. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences Switzerland*; 2010 p. 1321–42.
 263. Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, et al. The Antioxidant Effects of a Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012 May 29;2012:185867. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368594/>
 264. Lee K, Lee BJ, Bu Y. Protective effects of dihydrocaffeic acid, a coffee component metabolite, on a focal cerebral ischemia rat model. *Molecules*. 2015;
 265. Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010.
 266. Lardeau A, Poquet L. Phenolic acid metabolites derived from coffee consumption are unlikely to cross the blood-brain barrier. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;
 267. Bakuradze T, Boehm N, Janzowski C, Lang R, Hofmann T, Stockis JP, et al. Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: Results from an intervention study. *Mol Nutr Food Res*. 2011;
 268. Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell C*. 2004 Jan;61(2):192–208.
 269. Veskoukis AS, Margaritelis N V., Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Report*. 2018.

270. Margaritelis N V., Cobley JN, Paschalis V, Veskoukis AS, Theodorou AA, Kyparos A, et al. Going retro: Oxidative stress biomarkers in modern redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2016;
271. Baillet A, Chanteperdrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010;
272. Cavin C, Marin-Kuan M, Langouët S, Bezençon C, Guignard G, Verguet C, et al. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol [Internet].* 2008 Apr;46(4):1239–48. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004486>
273. Kafantaris I, Kotsampasi B, Christodoulou V, Kokka E, Kouka P, Terzopoulou Z, et al. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2016 Oct;
274. Gerasopoulos K, Stagos D, Petrotos K, Kokkas S, Kantas D, Goulas P, et al. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol.* 2015 Dec;86:319–27.
275. Kerasioti E, Terzopoulou Z, Komini O, Kafantaris I, Makri S, Stagos D, et al. Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicol Reports.* 2017;4:364–72.
276. Makri S, Kafantaris I, Stagos D, Chamokeridou T, Petrotos K, Gerasopoulos K, et al. Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food Chem Toxicol.* 2017 Jan;102:24–31.