



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

**Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στην ενζυμική
δραστικότητα της Οξειδάσης της Ξανθίνης, της Καταλάσης
και της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης.**

**“Effect of Coffee Extracts in enzymatic activity of Xanthine
Oxidase, Catalase and Superoxide Dismutase”**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΥΚΟΥΛΑΝΑΚΗ ΜΑΡΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αθανάσιος Τζιαμούρτας (επιβλέπων): Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας της άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Ο καφές είναι ένα εξαιρετικά δημοφιλές ρόφημα ανά τον κόσμο λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του (γεύση και άρωμα). Το ρόφημα προέρχεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea sp* και σαν φυτικό προϊόν περιέχει πληθώρα βιοδραστικών συστατικών όπως η καφεΐνη, πολυφαινόλες και άλλα, ενώ παράλληλα λόγω του καβουρδίσματος που υφίστανται οι κόκκοι είναι πιθανόν να αλλάζουν οι ιδιότητες τους. Λόγω του γεγονότος ότι είναι τόσο διαδεδομένος και καταναλώνεται παντού έχει στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω του και ως αποτέλεσμα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση των ιδιοτήτων του σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα, αλλά καθώς δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό δράσης, δεν είναι εύκολο να πραγματοποιηθούν στοχευμένες μελέτες. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν 9 δείγματα καφέ εκ των οποίων 3 πράσινοι και 6 αντίστοιχοι καβουρδισμένοι. Αρχικά ετοιμάστηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα για το κάθε δείγμα και εν συνεχεία μελετήθηκε η επίδρασή τους σε 3 ένζυμα του οξειδωτικού στρες. Την οξειδάση της ξανθίνης, την καταλάση και την υπεροξειδική δισμουτάση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα των καβουρδισμένων καφέδων είχαν αυξημένη ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης σε σχέση με τα πράσινα εκχυλίσματα. Μονάχα ένα ψημένο δείγμα καφέ (R4) είχε μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της καταλάσης, σε σχέση με τα πράσινα εκχυλίσματα. Τέλος, κανένα από αυτά δεν είχε επίδραση στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Abstract

Coffee is an extremely popular beverage worldwide due to its characteristic flavor and aroma. It is a brewed drink prepared from roasted coffee beans derived from the *Coffea* *sp* plant. As a plant derivative, coffee contains an abundance of bioactive compounds such as caffeine, polyphenols and other molecules some of which undergo changes during the procedure of roasting. Since it is so widely consumed, it has attracted scientific interest and several studies have been conducted in order to investigate its properties in various pathological situations. Encouraging results have been found, but due to the fact that there is no information concerning its molecular mechanism of action, targeted studies are difficult to be conducted. Therefore, in this study, nine coffee samples were examined, three of which are derived from green coffee beans and the remaining six from roasted beans. Polyphenolic extracts were prepared for each sample and their effect on the activity of three oxidative stress-related enzymes was examined, namely Xanthine Oxidase (XO), Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD). According to the results, all extracts exhibited inhibitory activity against XO and CAT, while none affected SOD. Roasted extracts were more potent inhibitors of XO compared to their green counterparts, while only a single roasted extract (R4) was a more potent CAT inhibitor compared to the respective green one.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αθανάσιου Τζιαμούρτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια του, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για την καθοριστική βοήθεια του και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή.....	2
Περίληψη	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες	8
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	8
1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$).....	10
1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}).....	10
1.2.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)	11
1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	11
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	12
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	12
1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”	13
1.4.3. Οξειδάση της ξανθίνης	14
1.4.4. Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες.....	17
1.4.5 Κυτόχρωμα P_{450}	20
1.4.6 Αυτοοξειδωση μορίων.....	20
1.5 Εξοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS	20
1.6 Βιολογική δράση των ROS	20
1.6.1 Θετικές επιδράσεις.....	20
1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις	21
1.7 Οξειδωτικό στρες	23
1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	25
1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά	25
1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά	29
1.9 Πολυφαινόλες.....	29
1.9.1. Ορισμός.....	29
1.9.2. Φυσικές Ιδιότητες Πολυφαινολών.....	30
1.9.3. Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών	31
1.9.4. Φλαβονοειδή.....	31
1.9.5. Μη φλαβονοειδή.....	33
1.9.6. Βιοσυνθεση και Βιοδιαθεσιμότητας πολυφαινολικών ενώσεων	35
1.9.7. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα τρόφιμα	36
1.9.8. Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικός Ρόλος.....	36
1.9.9. Αντιοξειδωτικές ιδιοτητες των πολυφαινολικών ενώσεων.....	36
1.9.10. Οξειδωτικές ιδιοτητες των πολυφαινολικών ενώσεων	37
1.9.11. Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	38
1.10 Καφές.....	39
2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	49
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
3.1 Υλικά και Μέθοδοι	50
3.2 Εκχυλίσματα.....	51
3.3 Προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος	52
3.4 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΞΑΝΘΙΝΗΣ	52

3.5 ΚΑΤΑΛΑΣΗ.....	53
3.6 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ	54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
4.1 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΞΑΝΘΙΝΗΣ	56
4.2 ΚΑΤΑΛΑΣΗ.....	57
4.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ	58
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	68

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο “ελεύθερες ρίζες” αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Cheeseman & Slater 1993). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles et al. 2001; Prior & Cao 1999).

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

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους, είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό. (K. Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta *et al.* 2004; AICR 2007; Pani *et al.* 2010), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010) ή τον άνθρακα.

1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου συνήθως περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ωστόσο, δεν αποτελούν όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη

μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Παπαγαλάνης 2014).

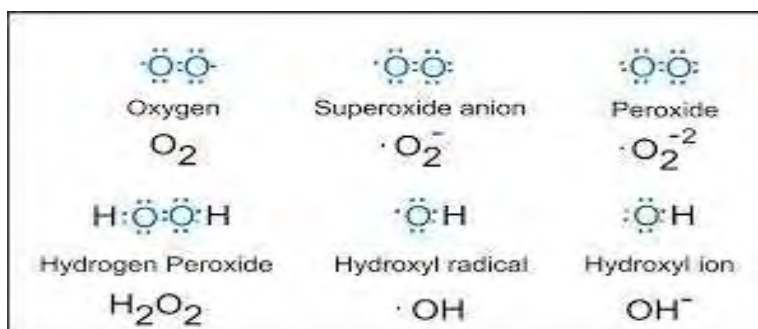
Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξείδωση και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$).

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

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



Εικόνα 1: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

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

Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου, $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τη οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης εισβαλόντων παθογόνων επειδή είναι ιδιαίτερα τοξικό (Halliwell 1995). Παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από τα συμπλέγματα I και II. Παράγεται ακόμα και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller et al. 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

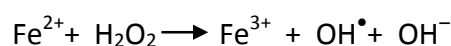
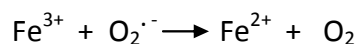
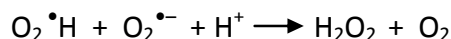
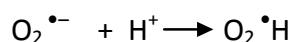
1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet})

Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα που, ωστόσο, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία των ριζών (Hayyan et al. 2016).

Η ρίζα υδροξυλίου συχνά παράγεται σαν παραπροϊόν της δράσης του ανοσοποιητικού και μπορεί να δράσει ενάντια σε όλα σχεδόν τα είδη μακρομορίων: υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και αμινοξέα (Reiter et al. 1995). Ο χρόνος ημιζωής της ρίζας υδροξυλίου *in vivo* είναι πολύ μικρός και για το λόγο αυτό είναι πολύ επικίνδυνη για τον οργανισμό (Reiter et al. 1997; Reiter et al. 1995). Σε αντίθεση με το ανιόν του σουπεροξειδίου το οποίο μπορεί να εξουδετερωθεί από την υπεροξειδική δισμουτάση, η ρίζα υδροξυλίου δεν μπορεί να αποτοξικοποιηθεί μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι το κύτταρο επιστρατεύει άλλους μηχανισμούς όπως είναι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά για να προστατευτεί από την επιβλαβή δράση του (Reiter et al. 1997).

Προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός

μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas 1999).



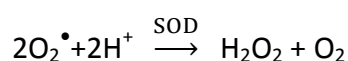
Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι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

1.2.3 Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Πρόκειται για ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton.



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



1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου

(Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO^\bullet και το διοξείδιο του αζώτου NO_2^\bullet καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO^-) (Fang et al. 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^\bullet)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^\bullet)	Κατιόν Νιτροσουλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσουλίου (NO^-)

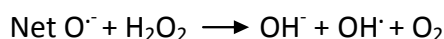
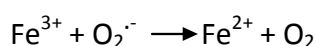
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $\text{O}_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (Chance et al. 1979b). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH_2 στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Chance et al. 1979b). Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $\text{O}_2^{\bullet-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^\bullet .

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθήση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ και NO_2^{\bullet} .

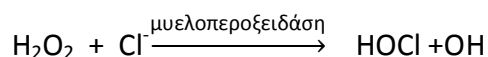
Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).

1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

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

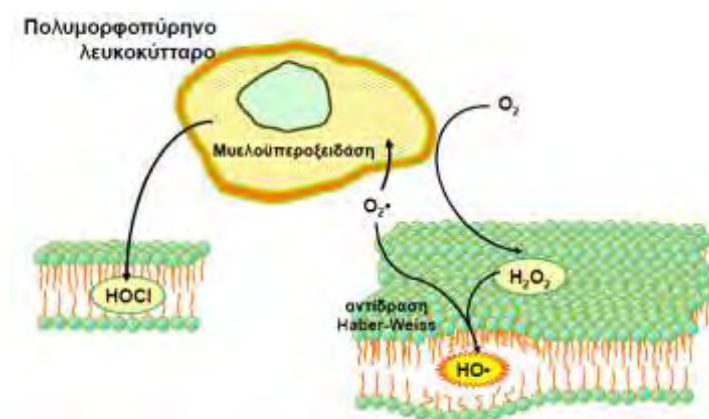
Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\bullet-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

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



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

αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει HOCl όπως είδαμε.



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα

1.4.3. Οξειδάση της ξανθίνης

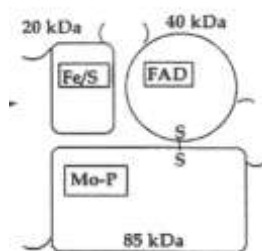
Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική υδροξυλίωση υποστρωμάτων πουρινών στο κέντρο μολυβδαινίου και οδηγεί σε μείωση του O_2 στο κέντρο της φλαβίνης με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), είτε ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Borges F. Et al., 2002).



Εικόνα 3: Δομή Οξειδάσης της Ξανθίνης

Πρωτεϊνική Δομή

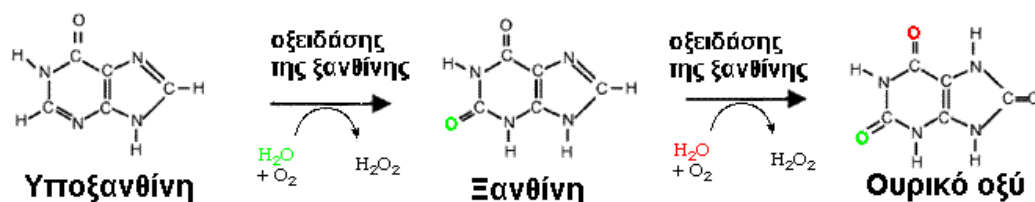
Η οξειδάση της ξανθίνης ανήκει στην κατηγορία των φλαβοπρωτεϊνών και είναι άφθονη ανάμεσα στα είδη και ανάμεσα στα διάφορα είδη ιστών των θηλαστικών (ήπαρ, καρδιά, εγκέφαλο, μύες, πάγκρεας, έντερο) (Borges F. et al., 2002). Αποτελείται από δύο υπομονάδες των 145kDa (Avis P.G. et al., 1956; Massey V. et al., 1969; Palmer G. et al., 1969; Kramer S.P. et al., 1987). Η αμινοξική αλληλουχία είναι υψηλά ομόλογη ανάμεσα στα ένζυμα των ποντικών, των αρουραίων και των ανθρώπων με 90% ομοιότητα (Nishino T. 1994).



Εικόνα 4: Μία από τις δύο υπομονάδες της οξειδάσης της ξανθίνης

Καταλυτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τόσο την υποξανθίνη όσο και την ξανθίνη τις οποίες οξειδώνει προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα.

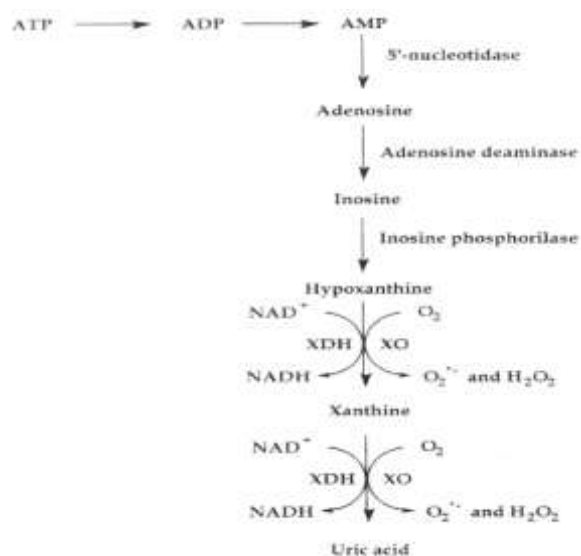


Εικόνα 5: Αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης

Η παραπάνω αντίδραση επιτελείται με την βοήθεια μολυβδαινίου (Mo) που περιέχει η οξειδάση της ξανθίνης στο ενεργό της κέντρο. Και στις δύο αντιδράσεις που καταλύει, ένα άτομο οξυγόνου από το μόριο του H_2O συνδέεται με το Mo και στη συνέχεια μεταφέρεται στην υποξανθίνη και την ξανθίνη προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα (Hille R., 2006).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν οξείδωσης των πουρινών. Πρόκειται για χημικές ενώσεις όπως η αδενίνη και η γουανίνη, που υπάρχουν στο DNA, στο RNA.



Εικόνα 6: Μονοπάτι σχηματισμού ουρικού οξέος

Παράγεται κατά το μεγαλύτερο μέρος στο ήπαρ και στη συνέχεια απεκκρίνεται από τους νεφρούς, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις του ανιχνεύονται στα ούρα. Το ουρικό οξύ αποτελεί ένα άφθονο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος (Maxwell, Jakeman, Thomason, Leguen, & Thorpeet, 1993).

Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος είναι οι ακόλουθοι:

1) Αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες, τις εξουδετερώνει και οξειδώνεται σε αλλαντοΐνη, οξονικό οξύ και παραβανικό οξύ.

2) Σχηματίζει σύμπλοκο με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}), δεσμεύοντάς τον και αναστέλλοντας την οξείδωση του ασκορβικού οξέος από αυτόν (Mikami, Yoshino & Ito, 2000).

Το ουρικό οξύ ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση τόσο σε κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικές μεμβράνες), όσο και σε γενετικό (DNA) (Hellsten, Sjödin, Richter, & Bangsbo, 1998). Επιπλέον κάποιοι ερευνητές θεωρούν ότι προστατεύει από οξείδωση και τα λιπίδια του πλάσματος (Yanai & Morimoto, 2004). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το ουρικό οξύ

αποτελεί ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά του αίματος. Ωστόσο υψηλές συγκεντρώσεις του συνδέονται με την ουρική αρθρίτιδα, μια μεταβολική πάθηση που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ουρικού οξέος στις αρθρώσεις. Οι δυο αυτές αντίθετες, ως προς την επίδραση στην υγεία, πλευρές του προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

1.4.4. Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες

Έχει παρατηρηθεί ότι σε καταστάσεις που οδηγούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (πχ έντονη άσκηση), εντείνεται η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η αυξημένη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης σχετίζεται με ασθένειες όπως η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η υπερχολήστερολαιμία, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση και ο διαβήτης.

Σε *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης του μυοκαρδίου, τα οποία συνεισφέρουν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες στην καρδιά (Ferdin and γ et al., 1999, 2000). Σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος καθώς και αύξηση στην δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο μυοκάρδιο (Leyva et al., 1998; Carrola et al., 2001). Στον διαβήτη τύπου 1 υπάρχει αύξηση στα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης στο πλάσμα και το ήπαρ (Desco et al., 2002).

Επίσης, στην καρδιά υπερτασικών ποντικών, οι Janssen et al. (1993) ανέφεραν αύξηση στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Έχει επίσης μελετηθεί η παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου από την οξειδάση της ξανθίνης κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση.

Υπάρχουν 5 διαφορετικοί μηχανισμοί παραγωγής ανιόντος σουπεροξειδίου:

- Η παραγωγή σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνεται λόγω μετατροπής της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης (Rasmussen et al., 2000; Saksela et al., 1999).
- Η αυξημένη έκφραση του mRNA της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και της οξειδάσης της ξανθίνης (Saksela et al., 1998).
- Όταν το ήπαρ γίνεται ισχαιμικό απελευθερώνει οξειδάση της ξανθίνης στην κυκλοφορία του αίματος (Sanhueza et al., 1992).
- Η οξειδάση της ξανθίνης προσδένεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και παράγει ελεύθερες ρίζες.

- Το ATP διασπάται σε ξανθίνη και υποξανθίνη, επομένως αυξάνει τα επίπεδα των υποστρωμάτων της οξειδάσης της ξανθίνης.

Τέλος έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξαντλητικής άσκησης παρατηρείται παραγωγή ROS.

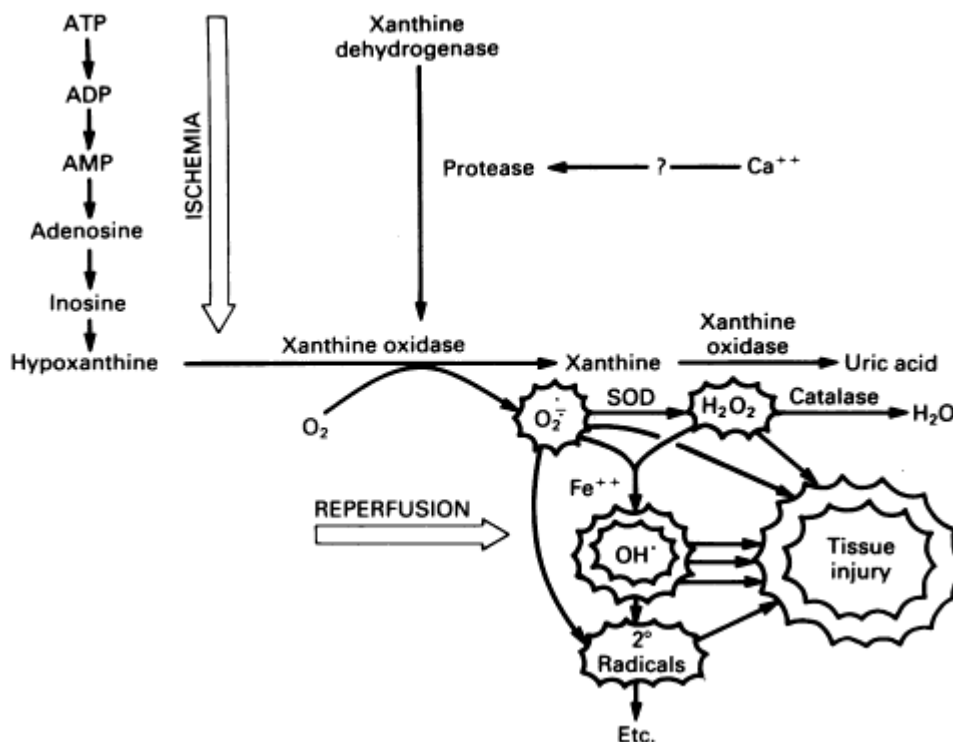
Η Οξειδάση Ξανθίνης κατά την άσκηση

Στο μυ, η XO είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη συστολή, η δραστηριότητα XO είναι σημαντικά αυξημένη και οδηγεί σε αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, μυϊκή βλάβη και οίδημα. Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης στην οποία καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες ATP, τα επίπεδα υποξανθίνης και ξανθίνης αυξάνονται και χρησιμεύουν ως υποστρώματα για την XO ώστε να παράγει ROS.

Είναι ενδιαφέρον, ότι τα ROS που παράγονται από την XO φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης που προκαλείται από άσκηση μέσω ενεργοποίησης του PGC-1.

Η βλάβη επαναιμάτωσης (επανοξυγόνωση) είναι η βλάβη ιστού που προκαλείται όταν επιστρέφει παροχή αίματος στον ιστό μετά από μια περίοδο ισχαιμίας ή έλλειψης οξυγόνου (ανοξία, υποξία). Η απουσία οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών από το αίμα κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής περιόδου, δημιουργεί μία κατάσταση στην οποία η αποκατάσταση της κυκλοφορίας οδηγεί σε φλεγμονή και οξειδωτικές βλάβες μέσω της επαγωγής του οξειδωτικού στρες (Bulkley 1987; Steinbacher & Eckl 2015).

Η επαναιμάτωση ισχαιμικών ιστών συνδέεται συχνά με αγγειακή βλάβη, ιδιαίτερα λόγω της αυξημένης διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων και αρτηριδίων που οδηγούν σε αύξηση της διάχυσης και διήθησης υγρού διαμέσου των ιστών. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν περισσότερα ROS μετά την επαναιμάτωση, γεγονός που οδηγεί σε φλεγμονώδη απόκριση (Carden & Granger 2000).



Μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών σε ισχαιμικούς ιστούς σε επαναιμάτωση.

Με την έναρξη της ισχαιμίας, το ATP μετατρέπεται σε υποξανθίνη. Υπό μη ισχαιμικές συνθήκες, η υποξανθίνη οξειδώνεται σε ξανθίνη και η ξανθίνη οξειδώνεται προς ουρικό οξύ κυρίως από την αφυδρογονάση της ξανθίνης ωστόσο παρατηρούνται και χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας οξειδάσης της ξανθίνης. Η χαμηλή δραστηριότητα αυτού του ενζύμου στους περισσότερους μη-ισχαιμικούς ιστούς υποδεικνύει ότι αυτή η αντίδραση είναι μάλλον βραδεία κάτω από κανονικές συνθήκες. Με την έναρξη της ισχαιμίας, ωστόσο, υπάρχει ταχεία πρωτεολυτική μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση ξανθίνης. Ως εκ τούτου, και το υπόστρωμα (υποξανθίνη) και το ενεργοποιημένο ένζυμο (οξειδάση της ξανθίνης) υπάρχουν σε περίσσεια, αλλά η αντίδραση δεν μπορεί να προχωρήσει κατά τη διάρκεια της περιόδου της ισχαιμίας, λόγω της απουσίας του μοριακού οξυγόνου. Αυτό το υπόστρωμα που λείπει τροφοδοτείται ξαφνικά και σε υπερβολικές ποσότητες, κατά τη στιγμή της επαναιμάτωσης, με την επακόλουθη ταχεία παραγωγή της ελεύθερης ρίζας υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$) + H_2O_2 ως υποπροϊόν. Το είδος αυτό μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη από μόνο του, ή μπορεί να παράγει δευτερογενή είδη ριζών. Η πιο σημαντική από αυτές είναι η εξαιρετικά αντιδραστική και εξαιρετικά τοξική ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), η οποία παράγεται από τη

καταλυόμενη αναγωγή του σιδήρου σε του H_2O_2 και O_2 , μια αντίδραση Fenton που περιγράφεται από Haber Weiss και (1934). (Bulkley 1987)

1.4.5 Κυτόχρωμα P_{450}

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

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\bullet-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al. 1979a). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\bullet-}$.

1.4.6 Αυτοοξείδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$).

1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες. Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al. 1998; Ray et al. 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και την έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια). (Elsayed et al. 1992; Jones et al. 2000; Obata et al. 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (B. Ames 1986; Kanner & Lapidot 2001; Lijinsky 1999).

1.6 Βιολογική δράση των ROS

1.6.1 Θετικές επιδράσεις

Μία ποσότητα ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως έκφραση γονιδίων (Ji et al., 2006) και η μεταγωγή σήματος (Ji, 2007). Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδο- όσο και διακυτταρικά. Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της

δραστικότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών. Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaud et al., 2006). Ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Reid, 2001; Linnane et al., 2002).

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), την αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al., 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτικότητας των μυϊκών ινών ενώ αύξηση των επιπέδων τους επιτείνει την ένταση της συστολής των μυϊκών ινών (Reid, 2001). Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

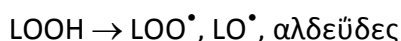
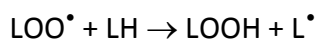
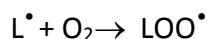
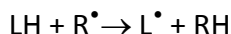
1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Μέσω αυτής της αρνητικής δράσης τους έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

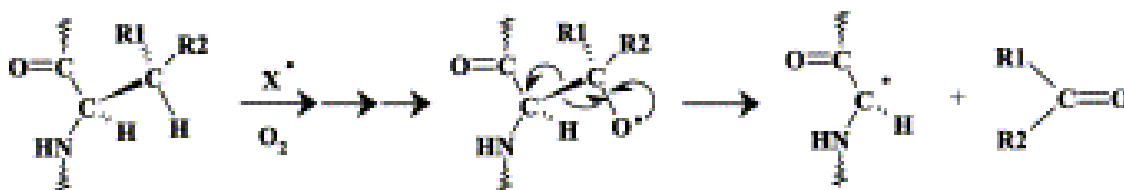
Λιπίδια → Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες οδηγώντας στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Alessio, 1993; Mylonas & Kouretas, 1999). Μία ελεύθερη ρίζα (R^\bullet) δηλαδή, μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH) και στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών. Οι αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό μιας ρίζας με κεντρικό μόριο τον άνθρακα (L^\bullet ή C^\bullet) η οποία στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο O_2 οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ρίζας περοξυλίου (LOO^\bullet ή γενικά ROO^\bullet), η οποία με την σειρά της μπορεί να αντιδράσει με έναν νέο υδρογονάνθρακα

οδηγώντας στον σχηματισμό νέας ρίζας η οποία μπορεί να ξαναξεκινήσει τον κύκλο των αντιδράσεων.

Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνονται παρακάτω:



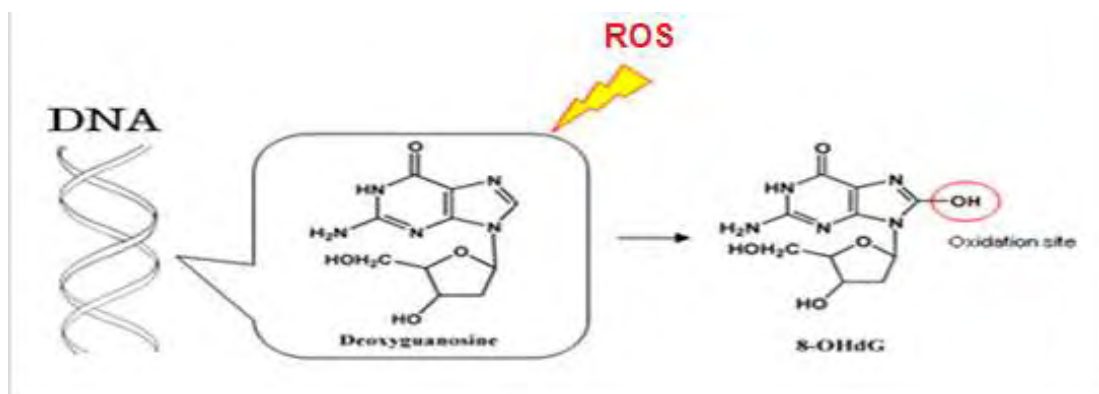
Πρωτεΐνες → Οι πρωτεΐνες είναι στόχος της δράσης των ελευθέρων ριζών όταν αυτές έχουν υψηλή συγκέντρωση. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH^\bullet , το RO^\bullet και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davies 1987; Grune et al. 1997; Levine & Stadtman 2001).



Εικόνα 7: Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης

DNA → Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της

θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Dizdaroglu et al. 2002; Helbock et al. 1999; B. N. Ames 1986).



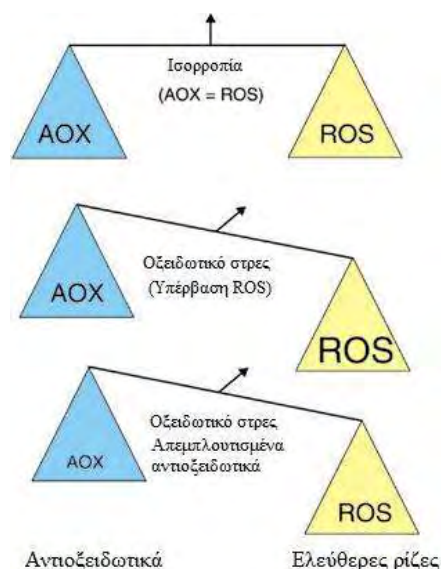
Εικόνα 8: Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

1.7 Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης ROS και RNS. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της ποσότητας ROS, RNS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του **οξειδωτικού στρες** (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS/RNS). Αυτό συμβαίνει είτε από έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε σε παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει:

- Βλάβη στους ιστούς. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του.
- Κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενο του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενο των κυττάρων περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, όπως CAT ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται σε θάνατο από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο “μηχανισμός αυτοκτονίας” του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα

κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001).

1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις ικανές είτε να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν τις διεργασίες οξείδωσης που συμβαίνουν υπό την επίδραση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου ή των δραστικών ειδών οξυγόνου ή αζώτου. Η αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky 2002).

Τα αντιοξειδωτικά εμπλέκονται στο μηχανισμό άμυνας του οργανισμού έναντι των παθολογιών που συνδέονται με την επίθεση των ελευθέρων ριζών. Για να προστατεύσουν τα κύτταρα και τα οργανικά συστήματα του σώματος έναντι των ελεύθερων ριζών, ο οργανισμός έχει εξελίξει ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας. Πρόκειται για μια ποικιλία συστατικών, τόσο ενδογενούς (από τον οργανισμό) όσο και εξωγενούς (κυρίως μέσω της διατροφής) προέλευσης, που λειτουργούν διαδραστικά και συνεργατικά για να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Mark et al., 1998). Το ενδογενές σύστημα περιλαμβάνει ενζυμικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες, ενώ αυτά που λαμβάνονται με τη διατροφή είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους (Alessio & Hagerman, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση:

- Την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή)
- Την διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα)
- Τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική)

1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

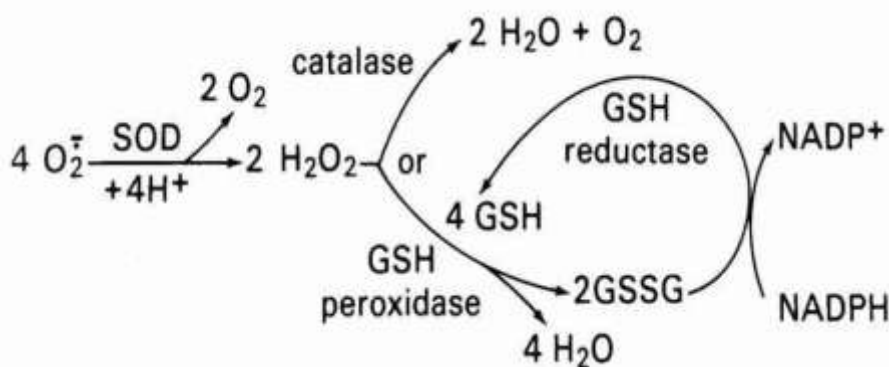
Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια

- ο Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

1.8.1.α Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

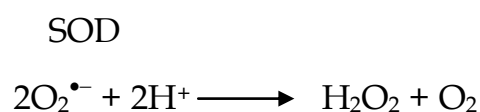
Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν άμεση επίδραση. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα 10: Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 , όπως δείχνει η παρακάτω αντίδραση.



Υπάρχει σε τρεις μορφές, την κυτταροπλασματική που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), τη μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό της κέντρο (MnSOD) και την εξωκυτταρική. Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου $O_2^{\bullet-}$ από τα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997).

Η κυτταροπλασματική μορφή της SOD (Cu/ZnSOD), είναι ένα ομοδιμερές 32 kD, και αποτελεί περίπου το 70% των μορφών της SOD. Είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων (Crapo et al., 1992). Η μιτοχονδριακή Mn-SOD είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες μεταξύ τους υπομονάδες 96 kD, που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα (Whittaker, 2000). Η εξωκυττάρια-SOD (Cu/ZnSOD) είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ στον εξωκυττάριο χώρο. Πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kD, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και το 0,5-17% των μορφών της SOD. Ο ρόλος της συγκεκριμένης μορφής SOD είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής της στους ιστούς (Oury et al., 1996).

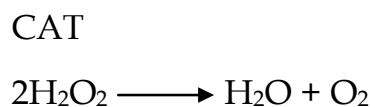
Η SOD θεωρείται ότι είναι από τα ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiels et al., 1994). Κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon 2000).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών οδηγώντας στην παραγωγή H_2O_2 (Antunes et al., 2002), αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Chance et al., 1986; Masters et al., 1986). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο

τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 (Halliwell&Gutteridge, 1998).

Η CAT καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



Το H_2O_2 που παράγεται από τη δράση της SOD διασπάται από την CAT κι έτσι αναστέλλει τόσο τις βλαβερές επιδράσεις του ίδιου στα βιομόρια όσο και τις επιδράσεις του OH^\bullet , στο οποίο μπορεί να μετατραπεί. Η αντιοξειδωτική δράση της CAT και της SOD ευνοεί την αύξηση της διάρκειας ζωής (Orr & Sohal, 1994). Έχει βρεθεί ότι τα δύο αυτά ένζυμα και αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ουρικό οξύ έχουν γραμμική ή σχεδόν γραμμική συσχέτιση με τη διάρκεια ζωής στα θηλαστικά (Cutler, 1984).

1.8.1.6 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Οι μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνουν τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες. Η βιταμίνη C και η βιταμίνη Ε είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki *et al.*, 2003). Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστο αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, αντιδρά απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης Ε, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.

Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10. (Gerogianni & Gourgoulialis, 2006).

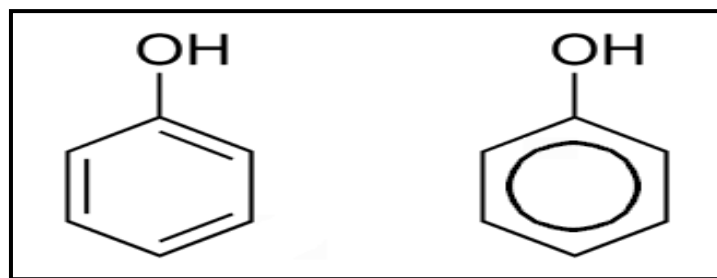
Για τους λόγους αυτούς υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για αντιοξειδωτικά, τα οποία βοηθούν στην πρόληψη και εξουδετέρωση των τοξικών συνεπειών των ελευθέρων ριζών στο ανθρώπινο σώμα (Molynieux, 2004).

1.9 Πολυφαινόλες

1.9.1. Ορισμός

Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Τα τελευταία χρόνια ένα πολύ μεγάλο εύρος ερευνών ασχολείται με την ταυτοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα και ποικίλα φυτικά παράγωγα (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006). Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών, είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006). Ιδιαίτερα οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες καθώς αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων.

Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau et al. 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 11: Δομή μιας φαινόλης

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio et al. 2010). Πιστεύεται ότι η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στα φυτά υποτιμάται, καθώς πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και τα παράγωγά τους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, ξεφεύγοντας από τις μεθόδους και τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η σύσταση σε πολυφαινόλες για τα περισσότερα φρούτα και αρκετών ποικιλιών σιτηρών δεν είναι ακόμα γνωστή.

Οι επιδράσεις στην υγεία εξαρτώνται από την ποσότητα που καταναλώνεται και από την βιοδιαθεσιμότητά τους. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε πολλά φαρμακευτικά φυτά, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστικότητα ενζύμων και τη λειτουργία κυτταρικών υποδοχέων (Middleton E. et al., 2000).

Βέβαια δεν απορροφούνται όλες οι πολυφαινόλες με την ίδια αποτελεσματικότητα. Μεταβολίζονται εκτενώς από ηπατικά και εντερικά ένζυμα και από την εντερική μικροχλωρίδα. Η γνώση της βιοδιαθεσιμότητας και του μεταβολισμού των ποικίλων πολυφαινολών είναι απαραίτητη για την εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων τους στους ιστούς.

1.9.2. Φυσικές Ιδιότητες Πολυφαινολών

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ιδίου

μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν. Επίσης, υπάρχουν και λιποδιαλυτές πολυφαινόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Διατηρούνται καλύτερα μέσα στον ατμό παρά μετά από τηγάνισμα.

1.9.3. Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών

Οι πολυφαινολικές ενώσεις ταξινομούνται με ποικίλους τρόπους, ως προς την προέλευση, τις ιδιότητες ή ως προς τη χημική τους δομή. Μια πολυφαινολική ένωση αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Vermeris & Nicholson, 2006).

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach *et al.* 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στο δακτυλίου τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε έξι υποομάδες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες και τις ανθοκυανιδίνες (Manach. *et al.*, 2004). Τα μη φλαβονοειδή χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες (Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier *et al.*, 2006).

1.9.4. Φλαβονοειδη

Βρίσκονται συνήθως με τη μορφή γλυκοζιτών και, ανάλογα με το σάκχαρο, τροποποιούνται και οι ιδιότητές τους (Manach *et al.*, 2004). Τα σταφύλια και τα προϊόντα τους αποτελούν κύρια πηγή των φλαβονοειδών (Manach *et al.*, 2004).

Φλαβονόλες: Είναι τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στα τρόφιμα και οι κύριοι αντιπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη και η καμπφερόλη. Γενικά βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι πλουσιότερες πηγές είναι τα κρεμμύδια, το μπρόκολο, τα πράσα. Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν μέχρι και 45mg φλαβονολών/L. Αυτές οι

ενώσεις είναι κυρίως παρούσες σε γλυκοσιλιωμένες μορφές στα τρόφιμα. Το μόριο σακχάρου είναι συχνά η γλυκόζη και η ραμνόζη αλλά εμπλέκονται κι άλλα σάκχαρα όπως γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ. Τα φρούτα συχνά περιέχουν μεταξύ 5 και 10 διαφορετικών γλυκοσιδίων φλαβονολών. Αυτές οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στους εξωτερικούς και εναέριους ιστούς επειδή η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από το φως (Manach C. et al., 2004).

Φλαβόνες: Είναι λιγότερο κοινές από ότι οι φλαβονόλες στα φρούτα και τα λαχανικά. Αποτελούνται κυρίως από γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης. Οι μόνες σημαντικές βρώσιμες πηγές που ανιχνεύθηκαν είναι ο μαϊντανός και το σέλινο. Σιτηρά όπως το κεχρί και το σιτάρι περιέχουν C-γλυκοσίδια φλαβονών. Το περίβλημα εσπεριδοειδών φρούτων περιέχει μεγάλες ποσότητες μεθοξυλιωμένων φλαβονών όπως τανγερετίνη, νοβιλετίνη και σινενσετίνη. Ανήκουν στα πιο υδροφοβικά φλαβονοειδή (Manach C. et al., 2004).

Φλαβανόνες: Βρίσκονται σε ντομάτες και αρωματικά φυτά όπως η μέντα αλλά είναι παρούσες σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή. Τα κύρια αγγλικόνια είναι η ναρινγενίνη στα γκρεϊπφρουτ, η εσπερετίνη στα πορτοκάλια και η εριοδουκτιόλη στα λεμόνια (Manach C. et al., 2004).

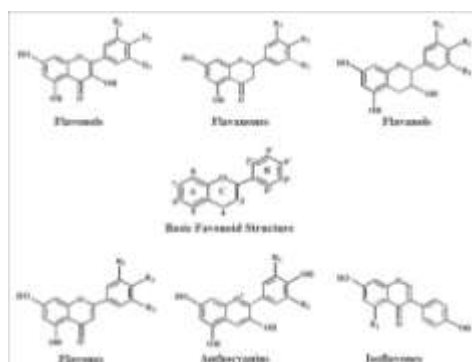
Ισοφλαβόνες: Είναι φλαβονοειδή που έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Αν και δεν είναι στεροειδή έχουν υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις 7 και 4' σε μια διαμόρφωση ανάλογη με αυτή των υδροξυλίων στο μόριο της οιστραδιόλης. Αυτό τους προσφέρει ψευδοορμονικές ιδιότητες, όπως να συνδέονται σε υποδοχείς οιστρογόνων και συνεπώς κατηγοριοποιούνται σαν ψευδοοιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται αποκλειστικά σε όσπρια. Η σόγια και τα επεξεργασμένα προϊόντα της είναι οι κύριες πηγές ισοφλαβονών (Manach C. et al., 2004).

Φλαβανόλες: Υπάρχουν τόσο με την μονομερή τους μορφή (κατεχίνη) όσο και με την πολυμερισμένη τους (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλούς τύπους φρούτων καθώς και στο κόκκινο κρασί, αλλά το πράσινο τσάι και η σοκολάτα είναι μακράν οι πλουσιότερες πηγές. Το μαύρο τσάι περιέχει λιγότερες μονομερείς φλαβανόλες οι οποίες οξειδώνονται κατά τη θέρμανση των φύλλων του σε θεαβλαβίνες (διμερή) και θεαρουβιγίνες (πολυμερή). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι οι κύριες φλαβανόλες στα φρούτα ενώ η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη βρίσκονται στα σταφύλια και κυρίως

στο τσάι. Σε αντίθεση με τις άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν γλυκοσυλιώνονται στα τρόφιμα (Manach C. et al., 2004).

Οι προανθοκυανιδίνες, που είναι επίσης γνωστές και σαν συμπυκνωμένες ταννίνες, είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή κατεχινών που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον C4 και C8 (ή C6). Είναι υπεύθυνες για τον στυπτικό χαρακτήρα των φρούτων (μήλα, αχλάδια, σταφύλια, ροδάκινα κ.α) και των ποτών (κρασί, τσάι, μπύρα κ.α) και για την πικρή γεύση της σοκολάτας (Manach C. et al., 2004).

Ανθοκυανίνες: Είναι χρωστικές ουσίες των φυτών και εντοπίζονται τόσο στον επιδερμικό ιστό όσο και στην σάρκα των καρπών προσδίδοντάς τους ροζ, κόκκινο, μπλε ή μωβ χρώμα. Υπάρχουν σε διάφορες χημικές δομές ανάλογα με το pH. Αν και είναι ασταθείς στην μη γλυκοσυλιωμένη μορφή, είναι ανθεκτικές στο φως, στο pH, και σε συνθήκες οξείδωσης. Η αποικοδόμηση τους αποτρέπει με γλυκοσιλίωση (μια γλυκόζη στη θέση 3') και εστεροποίηση με ποικίλα οργανικά και φαινολικά οξέα. Επιπλέον, σταθεροποιούνται με σχηματισμό συμπλεγμάτων με άλλα φλαβονοειδή. Στην ανθρώπινη διατροφή, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, σε ποικιλίες δημητριακών και σε λαχανικά (μελιτζάνες, λάχανα, φασόλια, κρεμμύδια, ραπανάκια) αλλά είναι πιο άφθονες στα φρούτα. Η κυανιδίνη είναι η πιο άφθονη ανθοκυανιδίνη στα τρόφιμα (Manach C. et al., 2004).



Εικόνα 12: Είδη φλαβονοειδών

1.9.5. Μη φλαβονοειδη

Φαινολικά Οξέα

Υπάρχουν δύο τάξεις φαινολικών οξέων, τα **υδροξυβενζοϊκά** και τα **υδροξυκινναμικά οξέα**. Το περιεχόμενο των βρώσιμων φυτών σε υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι γενικά χαμηλό με εξαίρεση συγκεκριμένα κόκκινα φρούτα, ραπανάκια και κρεμμύδια που μπορούν να έχουν συγκεντρώσεις δεκάδων mg/kg καθαρού βάρους. Το τσάι είναι μια

σημαντική πηγή γαλλικού οξέος καθώς τα φύλλα του περιέχουν έως 4.5g γαλλικού οξέος/kg καθαρού βάρους (Manach C. et al., 2004). Επιπλέον, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι συστατικά πολύπλοκων δομών όπως υδρολυόμενων ταννινών. Επειδή τόσο τα ελεύθερα όσο και τα εστεροποιημένα υδροξυβενζοϊκά οξέα, βρίσκονται μόνο σε λίγα βρώσιμα φυτά δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και δεν θεωρούνται μεγάλου θρεπτικού ενδιαφέροντος (Manach C. et al., 2004).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι πιο κοινά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και αποτελούνται κυρίως από το κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ. Αυτά τα οξέα σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή. Τα είδη των φρούτων που έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση (μήλα, κεράσια, ακτινίδια, δαμάσκηνα) περιέχουν 0.5-2g/kg καθαρού βάρους (Manach C. et al., 2004).

Λιγνάνια

Σχηματίζονται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου. Η πλουσιότερη διατροφική πηγή είναι ο λιναρόσπορος. Τα δημητριακά, τα σταφύλια, τα φρούτα και κάποια λαχανικά επίσης περιέχουν ίχνη λιγνανών, αλλά οι συγκεντρώσεις στον λιναρόσπορο είναι χίλιες φορές υψηλότερες. Τα λιγνάνια μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από την εντερική μικροχλωρίδα (Manach C. et al., 2004). Οι Thompson et al χρησιμοποίησαν μια *in vitro* τεχνική που περιελάμβανε ζύμωση των τροφίμων από ανθρώπινη μικροχλωρίδα και ποσοτικοποίηση των προδρόμων της εντεροδιόλης και της εντερολακτόνης, επιβεβαιώνοντας ότι ο λιναρόσπορος είναι η πλουσιότερη πηγή.

Στιλβένια

Τα στιλβένια βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διατροφή. Ένα από αυτά, η ρεσβερατρόλη, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς και της έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές ιδιότητες. Βρίσκεται σε υψηλές ποσότητες στο κόκκινο κρασί και τα σταφύλια (Manach C. et al., 2004). Δομικά, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με μία γέφυρα μεθυλενίου. Από τα πιο χαρακτηριστικά στιλβένια είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία είναι παρούσα στα σταφύλια και το κρασί σε υψηλές συγκεντρώσεις (Soleas et al., 1997).

1.9.6. Βιοσυνθεση και Βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολικών ενώσεων

Τα φλαβονοειδή και τα υδροξυκινναμικά οξέα παράγονται από το φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ. Αυτό μετατρέπεται σε φαινυλαλανίνη και ακολουθεί η μετατροπή της σε κινναμικό οξύ μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέως (Soleas et al., 1997). Τα δύο κυριότερα υδροξυκινναμικά οξέα, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ παράγονται από το π-κουμαρικό οξύ, το οποίο παράγεται από το κινναμικό οξύ. Όσον αφορά στο κυριότερο στυλβένιο, την *trans*-ρεσβερατρόλη, παράγεται μέσω συμπύκνωσης ενός μορίου π-κουμάρυλο-CoA με τρία μόρια μηλόνυλο-CoA μέσω της δράσης της συνθάσης της ρεσβερατρόλης (Soleas et al., 1997).

Όπως προαναφέρθηκε, οι πολυφαινόλες στην πλειοψηφία τους βρίσκονται γλυκοζυλιωμένες ή ως πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους γεγονός που εμποδίζει την απορρόφησή τους από τον οργανισμό. Για να απορροφηθούν και να χρησιμοποιηθούν, θα πρέπει να υδρολυθούν. Όταν οι πολυφαινόλες είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα, τότε υδρολυτικά ένζυμα του λεπτού εντέρου όπως οι β-γλυκοζιδάσες ενεργοποιούνται για την απομάκρυνση του σακχάρου. Μέσω αυτής της διαδικασίας οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε απλούστερα οργανικά οξέα, τα οποία απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ. Οι πολυφαινόλες που δε μεταβολίζονται από το λεπτό έντερο φτάνουν στο παχύ έντερο και διασπώνται από τη μικροχλωρίδα του. Αυτό δεν ισχύει για τις ανθοκυανίνες καθώς βρίσκονται στον οργανισμό σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Όσον αφορά στις πολυφαινόλες που βρίσκονται με τη μορφή πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους (ταννίνες), κατά το μεταβολισμό τους διασπώνται σε μικρότερες ενώσεις που μπορούν πιο εύκολα να απορροφηθούν (Manach et al., 2004; Scalbert & Williamson, 2000). Μετά την απομάκρυνση του σακχάρου ενεργοποιούνται τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού. Τα κυριότερα ένζυμα είναι οι κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες, οι γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες και οι σουλφοτρανσφεράσες, οι οποίες προσθέτουν μεθυλικές, γλυκουρονικές και θειικές ομάδες, αντίστοιχα (Kroon et al., 2004). Τελικά, οι πολυφαινόλες καταλήγουν μέσω της κυκλοφορίας στα ούρα και τη χολή, απ' όπου απεκκρίνονται (Manach et al., 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι η *in vivo* διαθεσιμότητα έχει μελετηθεί μόνο για λίγες πολυφαινόλες (Williamson & Manach, 2005; Rechner et al., 2002). Είναι, όμως, αποδεκτό ότι η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα δεν ξεπερνά το 1μM μετά από κατανάλωση ποσότητας 10-100mg (Scalbert & Williamson, 2000).

1.9.7. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα τρόφιμα

Τα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι και το κόκκινο κρασί αποτελούν τις κύριες πηγές των πολυφαινολικών ενώσεων στη διατροφή. Πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, χυμοί, τσάι, κρασί κ.α) ενώ άλλες βρίσκονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα όπως φλαβανόνες στα εσπεριδοειδή και ισοφλαβόνες στη σόγια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα τρόφιμα περιέχουν πολύπλοκα μίγματα πολυφαινολών. Για πολλά φυτικά προϊόντα, η πολυφαινολική σύσταση είναι λιγότερο γνωστή. (Shahidi F. and Naczk M., 1995).

1.9.8. Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικός Ρόλος

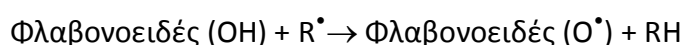
Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ. αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio et al. 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπρόσθετα, προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα, ενώ η αιτία που αναπτύσσουν τις επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητές τους είναι η εμπλοκή τους σε οξειδωτικές μεταβολές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manachet *al.* 2004; DiCarlo *et al.* 1999; Harborne 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών έχουν την ικανότητα να παρέχουν προστασία έναντι της σήψης.

1.9.9. Αντιοξειδωτικές ιδιοτητες των πολυφαινολικών ενώσεων

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν τόσο ως δέκτες ηλεκτρονίων όσο και ως δότες ατόμου H στις ελεύθερες ρίζες ($RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet}$). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις οξειδωτικές

αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και αποτρέπουν τις βλαβερές επιδράσεις τους στα βιομόρια. (Scalbert A. et al., 2005).

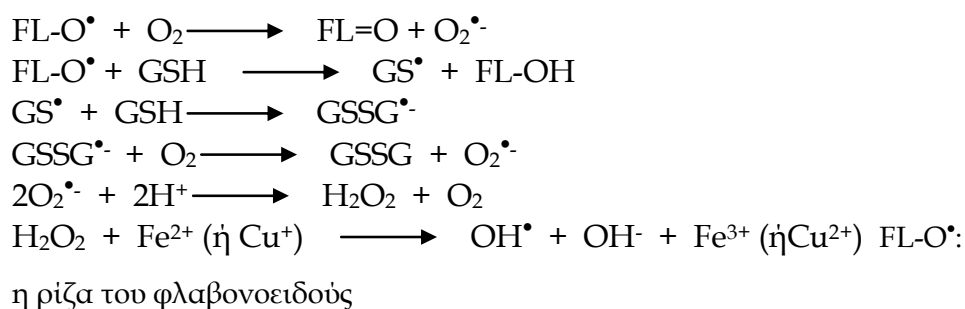
Χαρακτηριστική είναι η δράση των φλαβονοειδών τα οποία δεσμεύουν διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρώντας άμεσα με τη ρίζα. Λόγω της μεγάλης δραστικότητας των υδροξυλικών ομάδων των φλαβονοειδών οι ελεύθερες ρίζες αδρανοποιούνται και οι ρίζες των φλαβονοειδών που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες (Nijveldt et al., 2001).



Επιπλέον, οι πολυφαινόλες, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Fe^{+2} και Cu^+) παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της ρίζας OH^\bullet που παράγεται από την αντίδραση Fenton. Τέλος, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ferguson P.L., 2001). Ακόμη, επηρεάζουν τη δραστικότητα οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων και έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνουν την οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (Williamson & Manach, 2005; Dragsted, 2003).

1.9.10. Οξειδωτικές ιδιοτητες των πολυφαινολικών ενώσεων

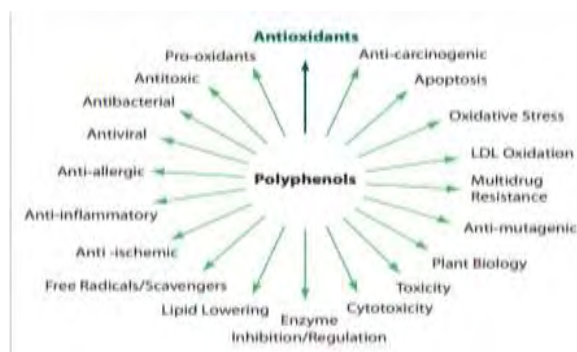
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας φαινολικής ρίζας. Συνήθως, η ρίζα αυτή δεν είναι ιδιαίτερα δραστική, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις που έχει υψηλή δραστικότητα και έτσι μπορεί να είναι η αιτία για την οξειδωτική τους δράση. Ορισμένα φλαβονοειδή, όταν δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, παράγουν αρκετά ασταθείς φαινολικές ρίζες. Οι ρίζες αυτές αντιδρούν με το O_2 ή την GSH και παράγουν $\text{O}_2^{\bullet-}$, το οποίο σχηματίζει H_2O_2 μέσω της συμμετοχής του στην αντίδραση Fenton (Cotelle, 2001).



Ένας ακόμα μηχανισμός της οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών σχετίζεται με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης Cu και Fe. Τα μέταλλα αυτά συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών με ταυτόχρονο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Αρχικά, η πολυφαινόλη μετατρέπει τον Cu^{2+} σε Cu^+ και η ίδια μετατρέπεται σε ρίζα, η οποία με την αντίδρασή της με το O_2 οδηγεί στην παραγωγή $\text{O}_2^{\bullet-}$. Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ αντιδρά με μία άλλη πολυφαινόλη ανακυκλώνοντας τη φαινολική ρίζα και σχηματίζοντας H_2O_2 , το οποίο συμμετέχει στην αντίδραση Fenton με τα Cu^+ σχηματίζοντας την ισχυρή οξειδωτική OH^{\bullet} (Sakihama et al., 2002). Τέλος, οι πολυφαινόλες μπορούν να προσβάλλουν και το DNA πιο άμεσα. Προς αυτή την κατεύθυνση έχειδειχτεί ότι φαινολικές ρίζες προερχόμενες από την κερκετίνη προκάλεσαν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA σε πυρήνες ηπατικών κυττάρων επιμύων (Sahu&Gray, 1997).

1.9.11. Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές, αντιαρτηρικές, καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Nijveldt et al., 2001, Crozier et al., 2009; Lambert et al., 2005). Οι καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες οφείλονται κυρίως στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που αποτελούν γεγονότα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (Ferguson et al., 2001; Soleas et. al., 1997). Θεωρούνται πολύ σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς σε όλα τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (Fresco et al., 2006; Manson et al., 2000; Le Marchand, 2002). Ακόμα παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στο διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo et al. 2014; Bouayed et al. 2011). Ωστόσο, ένα από τα δυσκολότερα προβλήματα για την εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων των πολυφαινολικών ενώσεων είναι ο μεγάλος αριθμός τους που υπάρχει στα τρόφιμα και οι διαφορετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν από ποικίλες *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Lambert et al., 2005; Ren et al., 2003). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες. (Εικ. 13)



Εικόνα 13: Παράγοντες στους οποίους οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική δράση

1.10 Καφές

Γενικά

Ο καφές είναι το ρόφημα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση στον κόσμο, μετά το νερό, με συνολική παραγωγή των 8.700.000 kg το 2013 (Διεθνής Οργανισμός Καφέ ICO, 2013). Εκτιμάται ότι 1,6 δισεκατομμύρια φλιτζάνια καφέ καταναλώνονται κάθε μέρα. Οι Αμερικανοί μόνο ξοδεύουν \$ 40 δισεκατομμύρια για καφέ κάθε χρόνο (Dirks-Naylor 2015). Ο καφές είναι εξαιρετικά δημοφιλής λόγω των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών (γεύση και άρωμα).

Το καφεόδεντρο ανήκει στην οικογένεια *Rubiaceae* και στο γένος *Coffea*, το οποίο έχει 103 είδη. *Coffea arabica* (καφέ Arabica) και *canephora Coffea* (καφέ Robusta) είναι τα μόνα είδη που χρησιμοποιούνται για την εμπορική παραγωγή, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 60 και 40%, αντίστοιχα, του κόσμου του καφέ market (Rodrigues et al. 2015). Ο καρπός του φυτού συλλέγεται όταν ωριμάσει, επεξεργάζεται και αποξηράνεται. Μετά την αποξήρανση οι κόκκοι καφέ συνήθως καβουρδίζονται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα αναλόγως με την επιθυμητή τελική γεύση (Maurin et al. 2007). Ωστόσο, υπάρχει και η επιλογή μη καβουρδίσματος και τότε μιλάμε για τον πράσινο καφέ.

Εξαιτίας της πικρής επίγευσης και της χαμηλής ποιότητας του *Coffea canephora*, ο *Coffea arabica* αποτελεί τα $\frac{3}{4}$ της καλλιέργειας καφέ σε παγκόσμια κλίμακα (Mitchell, 1988). Σημαντική διαφορά των δύο ειδών είναι η περιεκτικότητα σε καφεΐνη, όπου ο *Coffea canephora* περιέχει 30 – 40 % μεγαλύτερη συγκέντρωση. Γι αυτό το λόγο ο *canephora* θεωρείται πιο οικονομικός και συχνά χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του Arabica. Ο *Coffea arabica* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1753. Οι πιο γνωστές ποικιλίες είναι η Typica και η Bourbon. Πρόκειται για ένα ευμεγέθη θάμνο με πράσινα ωοειδή

φύλλα. Διαφέρει γενετικά αφού αποτελείται από τέσσερα χρωμοσώματα έναντι δύο των υπόλοιπων ειδών. Οι καρποί του φυτού έχουν, επίσης, ωοειδές σχήμα και ωριμάζουν σε χρονικό διάστημα 7 – 9 μηνών. Το συγκεκριμένο είδος καφέ είναι αρκετά ευάλωτο σε παράσιτα και ασθένειες (Clifford and Wilson, 1985). Ο *Coffea canephora* ονομάζεται και Robusta(εύρωστο) εξαιτίας της «δύναμης» του κορμού του. Μοιάζει περισσότερο με μικρό δένδρο παρά με θάμνο καθώς δύναται να φθάσει τα 10 m ύψος. Οι καρποί του φυτού έχουν στρογγυλό σχήμα και χρειάζονται περίπου 11 μήνες για να ωριμάσουν ενώ οι σπόροι του έχουν ωοειδές σχήμα και είναι εμφανώς μικρότεροι σε μέγεθος από αυτούς του *Coffea arabica*. Ενδεικτικό στοιχείο της ευρωστίας του είναι ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμότερα κλίματα από τον *arabica* σε περιοχές όπως η δυτική και κεντρική Αφρική, τη νοτιοανατολική Ασία και σε επιλεγμένες περιοχές της Βραζιλίας (Mitchell, 1988).

Σε κάθε περίπτωση για να αρχίσει το φυτό να αποδίδει καρπούς απαιτείται ένα χρονικό διάστημα 3 – 4 ετών. Κάθε δένδρο αποδίδει 2 – 4kg καρπούς, όπου 100 kg καρπών αποδίδουν 12 – 20 kg έτοιμου καφέ.

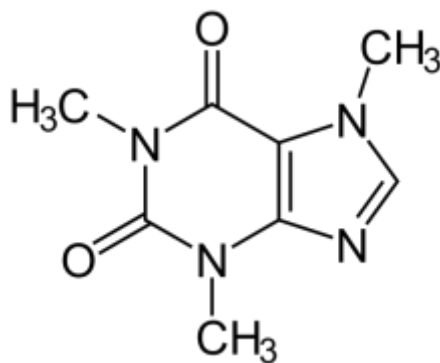
Μια τεχνητή διαδικασία που προηγείται του ψησίματος του καφέ είναι η «αποκαφεϊνοποίηση», δηλ. η παραγωγή του «ντεκαφεϊνέ» ροφήματος. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τους «πράσινους» κόκκους καφέ (Colin, 2004).

Χημική σύσταση του καφέ

Ο καφές περιέχει περισσότερα από 1.000 χημικά συστατικά καθιστώντας έτσι ένα σύνθετο μίγμα (Dirks-Naylor 2015). Μερικές ουσίες είναι υδατάνθρακες, λιπίδια, βιταμίνες, αζωτούχες ενώσεις, ισοφλαβονοειδή, και μικροθρεπτικά συστατικά. Τα κύρια συστατικά του καφέ είναι η καφεΐνη, καφεστόλη και καφεόλη, χλωρογενικό οξύ (CGA), και μικροθρεπτικά συστατικών (Akash et al. 2014). Γνωστά συστατικά του καφέ περιλαμβάνουν καφεΐνη, διτερπένια (λιπίδια καφέ), φαινολικά οξέα, και μελανοΐδινες, N-μεθυλοπυριδινίου, και ακρυλαμιδίου που παράγονται κατά το καβούρντισμα των κόκκων καφέ. Οι σημαντικότερες πολυφαινόλες του καφέ είναι τα χλωρογενικά οξέα και οι μεταβολίτες τους, συμπεριλαμβανομένων το κινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ (Bøhn et al. 2014). Ο τύπος του κόκκου καφέ, η διαδικασία ψησίματος, και η διαδικασία παρασκευής / βρασμού μπορούν να επηρεάσουν τη χημική σύσταση του υγρού καφέ που καταναλώνεται.

Ο πράσινος καφές αποτελείται κυρίως από νερό, υδατάνθρακες και ίνες, πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα, οργανικά οξέα, χλωρογενικά οξέα, τριγονελλίνη και καφεΐνη(Rodrigues et al. 2015).Από αυτά, τα χλωρογενικά οξέα, η τριγονελλίνη, η καφεΐνη, οι διαλυτές ίνες και τα διτερπένια των λιπιδίων είναι τα πιο βιοενεργά και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να παίζουν σημαντικό στη διαμόρφωση της γεύσης του ροφήματος μετά το καβούρδισμα.

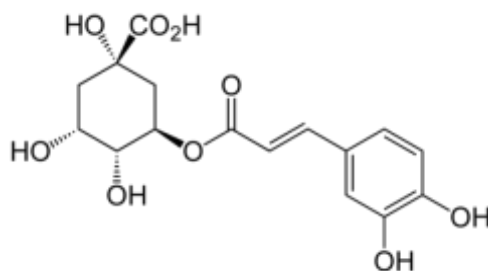
Καφεΐνη: είναι μία μεθυλξανθίνη με πικρή γεύση που, μολαταύτα, συμβάλλει κατά λιγότερο από 10% της πικράδας του ροφήματος καφέ. Αυτό το αλκαλοειδές είναι ανθεκτικό στη θερμότητα και η συγκέντρωση του στο *C. canephora* είναι περίπου διπλάσια από αυτή στο *C. arabica*. Η συγκέντρωση της καφεΐνης σ' ένα καφεϊνούχο ρόφημα εξαρτάται τόσο από τη μέθοδο παρασκευής όσο και από τον τύπο του καφέ. Μερικοί από τους παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωσή της είναι ο χρόνος παρασκευής, η θερμοκρασία, το άλεσμα και ο τύπος του καφέ. Ωστόσο, η συγκέντρωση της καφεΐνης μπορεί να διαφοροποιείται και στο ίδιο το φυτό. Εν γένει, ένα φλιτζάνι καφέ εσπρέσο περιέχει 80 – 100 mg καφεΐνης ενώ ένα φλιτζάνι φιλτραρισμένου καφέ 100 – 125 mg. Η καφεΐνη απορροφάται ταχέως από το γαστρεντερικό σωλήνα και διανέμει ταχέως (Akash et al. 2014)σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Η καφεΐνη παρουσιάζει διάφορες βιολογικές δραστηριότητες, όπως διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος, διουρητική δράση, περιφερική αγγειοσυστολή, χαλάρωση των λείων μυών, και έπαγωγή καρδιακού ρυθμού(Rodrigues et al. 2015). Παρόλο που η πρόσληψη καφεΐνης έχει συσχετιστεί με υψηλή χοληστερόλη, στεφανιαίες νόσους και καρκίνο, άλλες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ευεργετικές επιδράσεις της στη υγεία όπως μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος (Adriana Farah et al. 2006). Επιπρόσθετα, κάποιοι μεταβολίτες της καφεΐνης (κυρίως 1-μεθυλξανθίνη και 1-μεθυλουρικό) έχουν παρουσιάσει αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro*(Lee 2000).



Εικόνα 14: Δομή καφεΐνης

Τα τελευταία χρόνια, μια σειρά από επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η κατανάλωση καφέ, ανεξάρτητα από την πρόσληψη καφεΐνης, συνδέεται με οφέλη για την υγεία, όπως χαμηλότερο κίνδυνο διαβήτη τύπου 2 (Salazar-Martinez et al. 2004; Agardh et al. 2004), Parkinson και Alzheimer (Lindsay et al. 2002), και καρκίνο του ήπατος (Larsson & Wolk 2007). Οι κύριες πηγές δεδομένων που αποδίδουν αυτές τις ευεργετικές ιδιότητες των χλωρογενικών οξέων είναι μελέτες *in vitro* και μελέτες σε ζώα (Johnston et al. 2003; Herrera-Arellano et al. 2004; Pellegrini et al. 2003).

Χλωρογενικά οξέα: Είναι φαινολικές ενώσεις που σχηματίζονται από την εστεροποίηση κινναμωμικών οξέων, όπως το καφεϊκό, το φερούλικό, και ρ-κουμαρικό οξύ, με (-) –κινικό οξύ. Τα χλωρογενικά οξέα συμβάλλουν στη γεύση των ροφημάτων καφέ προσδίδοντας στυφότητα, πικράδα και οξύτητα. Μολαταύτα, εάν είναι παρόντα σε υψηλές ποσότητες στο πράσινο καφέ, ενδέχεται να δημιουργήσουν ανεπιθύμητη γεύση, πιθανόν λόγω του σχηματισμού προϊόντων οξειδωσης και αποικοδόμησης κατά το καβούρδισμα (A Farah et al. 2006). Η περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ στο φυτό *C. canephora* είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη από αυτή του *C. arabica*, αν και γενικά αυτή η συγκέντρωση ποικίλλει σημαντικά στα δύο είδη. Λόγω της θερμικής τους αστάθειας, τα χλωρογενικά οξέα υφίστανται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, όπως ισομερισμό, επιμερισμό, αποικοδόμηση σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και ενσωμάτωση σε μελανοΐδινες, συμβάλλοντας στο χρώμα και στη γεύση.



Εικόνα 15: Δομή χλωρογενικού οξέος

Τα χλωρογενικά οξέα έχουν συσχετιστεί σε μια σειρά από οφέλη για την υγεία, όπως η μείωση του ΣΔ2 και αντιυπερτασική δραστηριότητα, καθώς και αντιβακτηριακές, αντι-φλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Rodrigues et al. 2015), η μείωση του σχετικού κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, και η νόσος του Alzheimer (Farah A, Monteiro M, Donangelo CM 2008). Με όλα τα χημικά συστατικά του καφέ, είναι πιθανό ότι το μίγμα αυτών των συστατικών να είναι υπεύθυνο για την μεγιστοποίηση των οφελών για την υγεία και όχι το οποιαδήποτε επιμέρους συστατικό.

Από έρευνες προκύπτει ότι ένα μεγάλο ποσοστό τους αποικοδομείται κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος (Trugo & Macrae 1984), ένα ποσοστό τους ενσωματώνεται στις μελανοϊδίνες που σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις Maillard (Perrone, Farah & C. M. Donangelo 2012; Moreira et al. 2012) και υπάρχουν μόρια που παραμένουν ελεύθερα.

Έχει βρεθεί επίσης ότι οι μελανοϊδίνες φτάνουν στο κόλον σε ποσοστό 100%, ενώ τα χλωρογενικά οξέα φτάνουν σε ποσοστό 70%. Αυτό σημαίνει ότι μόνο το 30% των προσλαμβανόμενων ενώσεων απορροφάται από το λεπτό έντερο, ενώ το υπόλοιπο μέρος μεταβολίζεται από τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου. (Vitaglione et al. 2012).

Πράσινος (ή ακατέργαστος) καφές είναι μια σημαντική πηγή CGA στη φύση (5-12 g / 100 g). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση εκχυλισμάτων πράσινου καφέ έχει αντιυπερτασική δράση σε αρουραίους και ανθρώπους, βελτίωση της ανθρώπινης αγγειοαντιδραστικότητας, ανασταλτικό αποτέλεσμα επί της συσσώρευσης λίπους και του σωματικού βάρους σε ποντίκια και ανθρώπους και διαμόρφωση του μεταβολισμού της γλυκόζης σε ανθρώπους. Τέτοιες βιολογικές επιδράσεις έχουν αποδοθεί σε CGA που υπάρχουν στο πράσινο καφέ. (Farah A, Monteiro M, Donangelo CM 2008).

Καφεστόλη και καφεόλη:

Είναι πεντακυκλικά διτερπένια με σκελετό καουρενίου. Μεθυλιωμένες μορφές αυτών έχουν βρεθεί σε σπόρους Robusta. Αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις και τα παράγωγά τους, τα οποία είναι κυρίως άλατα ή εστέρες λιπαρών οξέων, αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του λιπιδικού κλάσματος του καφέ (Wattenberg 1983; Cavin et al. 2002). Η καφεστόλη είναι το πρωτογενές συστατικό του μη σαπωνοποιητικού κλάσματος λιπιδίων καφέ που αντιπροσωπεύει περίπου το 0,2% -0,6% του βάρους του καφέ. Η καφεόλη είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα, το οξυγόνο, το φως, και τα οξέα και συνεπώς είναι λιγότερο άφθονη. Το *C. Arabica* έχει υψηλότερα επίπεδα διτερπενίων σε σχέση με το είδος *C. canephora*.

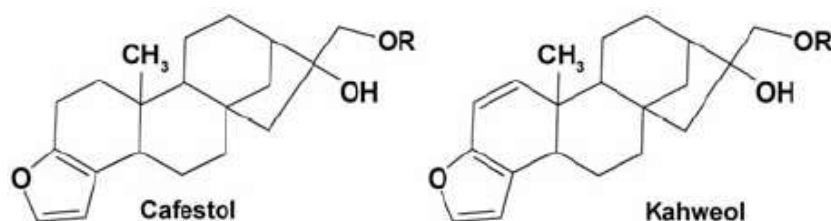
Όσον αφορά τα διτερπένια, παρά το γεγονός ότι είναι πιο ευαίσθητα στη θερμότητα, μπορούν ακόμα να βρεθούν στον καβουρδισμένο καφέ (ειδικά σε *C. arabica*) σε αξιοσημείωτες ποσότητες (0,2- 0,9g/100g ξηρού βάρους).

Τα διτερπένια του καφέ παρουσίασαν αντικαρκινικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες *in vitro* (Wattenberg 1983; Cavin et al. 2002). Από την άλλη πλευρά όμως, η υψηλή κατανάλωση αυτών των ενώσεων έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο ανθρώπινο πλάσμα, γεγονός που μπορεί έμμεσα να αυξήσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Olthof et al. 2001). Αυτές οι ενώσεις είναι παρούσες κατά κύριο λόγο στον μη φιλτραρισμένο καφέ, αφού είναι δυσδιάλυτες στο νερό και ως εκ τούτου παγιδεύονται από τα φίλτρα χαρτιού.

Μετά την κατάποση του καφέ, τα χλωρογενικά οξέα εμφανίζονται στο κυκλοφορικό σύστημα, υπό τη μορφή μεθυλιωμένων, θειωμένων, και γλυκουρονιδιωμένων μεταβολιτών στο πλάσμα που οι συγκεντρώσεις σπάνια υπερβαίνουν τα nM. Σημαντικές ποσότητες τόσο των μητρικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους περνούν στο κόλον, όπου διασπώνται από τη δράση της τοπικής μικροχλωρίδας, προκαλώντας κυρίως μικρά φαινολικά οξέα και αρωματικούς καταβολίτες που απορροφώνται στο κυκλοφορικό σύστημα (Rodrigues et al. 2015).

Ανάλογα με τις συνθήκες καβουρδίσματος, τα φυσικά αντιοξειδωτικά του καφέ εν μέρει αποσυντίθενται ή συνδέονται με πολυμερείς δομές. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του ψησίματος στην παραγωγή προϊόντων της αντίδρασης Maillard (μελανοΐδινες), εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Προηγουμένως, επιβεβαιώθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του καβουρδισμένου καφέ ξεπέρασε εκείνη των πράσινων

κόκκων καφέ, και μια βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε για μεσαίου ψησίματος δείγματα (Brezová et al. 2009).



Εικόνα 16: Δομή καφεστόλης και καφεόλης

Μελανοϊδίνες

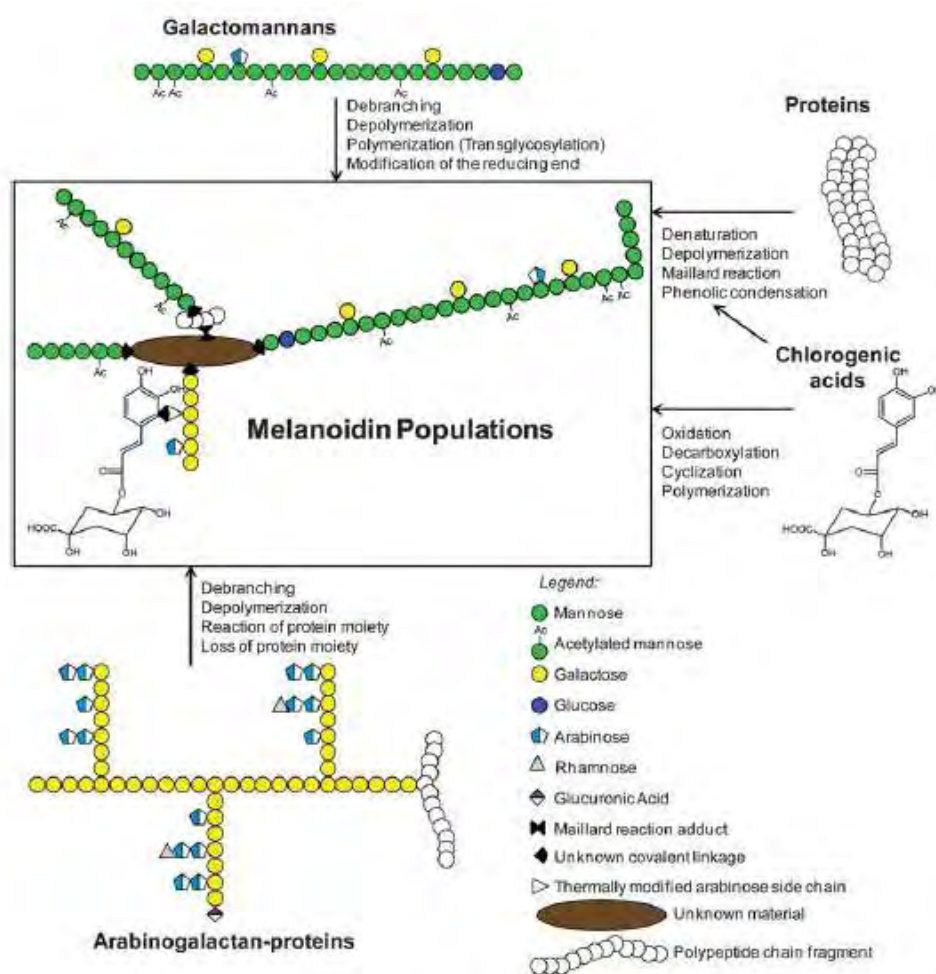
Κατά τη διάρκεια του ψησίματος του καφέ, οι πρωτεΐνες ενώνονται με τα σάκχαρα, σχηματίζοντας αντιδράσεις Maillard. Από τις αντιδράσεις Maillard σχηματίζονται τόσο μελανοϊδίνες, που ευθύνονται για το καφέ χρώμα του καφέ, όσο και αρωματικές ενώσεις όπως πυραζόλια και πυριδίνες που είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό άρωμα του καφέ. Τέλος, η πικρή γεύση του καφέ οφείλεται ως επί το πλείστον στην αντίδραση Maillard.

Το καβούρδισμα των πράσινων κόκκων καφέ είναι ένα σημαντικό βήμα για την επεξεργασία του καφέ. Το χαρακτηριστικό άρωμα, η γεύση και το χρώμα του ροφήματος καφέ, που παρασκευάζεται με εκχύλιση με ζεστό νερό από καβουρδισμένο και αλεσμένο καφέ σε κόκκους, σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από την επεξεργασία ψησίματος (Moreira et al. 2012).

Πολλές πολύπλοκες φυσικές και χημικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, συμπεριλαμβανομένης και της προφανής αλλαγής στο χρώμα από πράσινο σε καφέ. Οι μεγάλες αλλαγές που συμβαίνουν στη σύνθεση είναι μειώσεις σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, αραβινογαλακτάνη, αναγωγικά σάκχαρα, τριγωνελλίνη, χλωρογενικό οξύ, σακχαρόζη και νερό και από την άλλη πλευρά, δομικά, ο σχηματισμός των μελανοϊδινών. Πολλές από τις αλλαγές οφείλονται στην αντίδραση Maillard (Pérez-Hernández et al. 2012)

Αυτή η μη ενζυματική αντίδραση αμαύρωσης περιλαμβάνει ένα δίκτυο των διαφόρων αντιδράσεων μεταξύ αναγωγικών σακχάρων και ενώσεων με μια ελεύθερη αμινομάδα που σχηματίζει μια ποικιλία προϊόντων, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν ως προϊόντα πρώιμου σταδίου, τα προϊόντα ενδιάμεσου σταδίου, και τα προϊόντα τελευταίου

σταδίου. Οι μελανοΐδινες γενικά ορίζονται ως υψηλού μοριακού βάρους αζωτούχες και καφέ χρώματος ενώσεις. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τις χημικές δομές τους, παρόλο που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας ενός μεγάλου φάσματος προϊόντων τροφίμων πέρα από τον καφέ (Moreira et al. 2012). Οι μελανοΐδινες περιέχουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και χλωρογενικά οξέα στο μόριό τους αλλά η ακριβής δομή τους δεν είναι γνωστή ούτε και οι μηχανισμοί που οδηγούν στο σχηματισμό τους. Έχει προταθεί η δομή ενός σκελετού που σχηματίζεται η οποία φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 17: Δομή σκελετού μελανοιδινών που έχει προταθεί

Επειδή οι μελανοΐδινες δεν μπορούν να αναλυθούν άμεσα λόγω της αβεβαιότητας της δομής τους, γίνεται συνήθως ποσοτικά με διαφορά, αφαιρώντας το συνολικό ποσοστό των γνωστών ενώσεων από 100 τοις εκατό. Χρησιμοποιώντας αυτό το κριτήριο, που εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύουν έως και περίπου 25% (w/w) του ξηρού βάρους του

καβουρδισμένου καφέ. Σε ρόφημα καφέ, οι μελανοΐδινες εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύουν περίπου έως και 29% της ξηράς ύλης, ποσοτικά με διαφορά. Το περιεχόμενο μελανοΐδινης σε ρόφημα καφέ έχει επίσης αξιολογηθεί με βάση τη συμβολή του στο καφετί χρώμα, χρησιμοποιώντας χρωματική ανάλυση αραίωσης, ή μετρώντας την απορρόφηση κοντά στα 400 nm, ιδιαίτερα στα 405 nm (Moreira et al. 2012). Έχει βρεθεί σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί in vitro ότι οι μελανοΐδινες διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία έχει προταθεί ότι οφείλεται σε χαμηλού μοριακού βάρους μόρια που είναι συνδεδεμένα μη ομοιοπολικά στο σκελετό, όπως χλωρογενικά οξέα (Perrone, Farah & C. Donangelo 2012)(Moreira et al. 2012).

Ως εκτούτου, το ποσό των μελανοΐδινών που βρέθηκε σε καβουρδισμένο καφέ ήταν μεγαλύτερο από ότι οι μελανοΐδινες που βρέθηκαν σε πράσινους κόκκους καφέ.

Επιδράσεις στην υγεία

Οι μελανοΐδινες έχουν αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα να αναστέλλουν μεταλλοπρωτεάσες μήτρας, αντιμικροβιακή δραστηριότητα και την ικανότητα ρύθμισης του βακτηριακού πληθυσμού του παχέος εντέρου, αντιφλεγμονώδεις, αντιυπερτασικές, και αντιγλυκαιμικές ιδιότητες. Πέρα από την αντιοξειδωτική δράση που παρέχεται από καφέδες λόγω των μελανοΐδινών και άλλων συστατικών, οι μελέτες που δημοσιεύτηκαν μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η ποσότητα των μελανοΐδινών που προσλαμβάνεται κατά τη διάρκεια της τακτικής πρόσληψης καφέ θα πρέπει να παρέχει προστασία έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου με αναστολή μεταλλοπρωτεασών μήτρας, την προώθηση επιλεκτικής ανάπτυξης βακτηριδίων στο κόλον, αλλά και αντιφλεγμονώδεις και αντιγλυκαιμικές επιδράσεις (Moreira et al. 2012).

1. Επίδραση του καφέ στην υγεία

Η κατανάλωση καφέ έχει συσχετιστεί με μια πληθώρα από οφέλη για την υγεία και τη μείωση του κινδύνου πολλών χρόνιων ασθενειών όπως, η νόσος του Πάρκινσον, διάφορους καρκίνους, στεφανιαία νόσο, καρδιακές αρρυθμίες, εγκεφαλικό επεισόδιο (Dirks-Naylor 2015). Αρκετά συστατικά του καφέ μπορεί να βελτιώσουν τα συμπτώματα του ΣΔ2 επηρεάζοντας τη ρύθμιση της γλυκόζης. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν τις επιπτώσεις της CGA επί της γλυκόζης-6-φωσφατάσης, την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων σε 1-γλυκοσιδάση, και τα αποτελέσματα της καφεΐνης στην έκκριση

ινσουλίνης. Ο καφές χρησιμοποιείται ως εργογόνο στον αθλητισμό και είναι επίσης χρήσιμος για επαγγελματίες και ερασιτέχνες αθλητές που εκτελούν την κατάρτιση αντίστασης. Σημαντικές βελτιώσεις έχουν παρατηρηθεί στην αθλητική απόδοση μετά την κατανάλωση καφέ (Akash et al. 2014).

Υπάρχει μια σταθερά αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης καφέ και των κινδύνων για καρκίνο του ήπατος. Υπάρχει επίσης συσώρευση αποδείξεων που δείχνουν προς προστατευτικές επιδράσεις για τον κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου. Πολλές ενώσεις του καφέ έχουν τη δυνατότητα να επάγουν βιολογικές επιδράσεις. Η καφεΐνη, το χλωρογενικό οξύ, καφεόλη και καφεστόλη είναι μέχρι στιγμής οι πιο μελετημένες στην προοπτική των καρκίνων. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν συστάσεις για την κατανάλωση καφέ στις εθνικές διατροφικές κατευθυντήριες γραμμές (Bøhn et al. 2014).

Αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) από ενδογενείς και εξωγενείς πηγές επάγουν αλλαγές του DNA, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μετάλλαξη κυττάρων. Αρχικές μελέτες σχετικά με τον καφέ εντόπισαν δυναμικό μεταλλαξιγένεσης, αν και είναι αξιοσημείωτο πως χρησιμοποιήθηκαν δείγματα καβουρδισμένα σε υπερβολικό βαθμό ή πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις καφέ. Επιπλέον, οι μη-φυσιολογικές δόσεις των ενώσεων καφέ όπως μελανοΐδινες ή καφεΐνη έχουν συσχετιστεί με οξειδωτικά φαινόμενα. Αντιθέτως, μια μικρή ποσότητα καφέ έχει μια ισχυρή προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης (Monente et al. 2015).

Επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η μέτρια κατανάλωση καφέ συνδέεται με μια μείωση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης αρκετών ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος, η νόσος Alzheimer, ηπατική κίρρωση, και ο καρκίνο του ήπατος και του παχέος εντέρου. Αυτό το φαινόμενο έχει αποδοθεί κυρίως στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ροφήματος καφέ. Ο καφές κατέχει την υψηλότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση, ανάμεσα σε συνηθισμένα ροφήματα που καταναλώνονται και η συμβολή του στη συνολική πρόσληψη αντιοξειδωτικών από τη διατροφή μπορεί να φτάσει έως και το 70% στη Δυτική διατροφή. Τα χλωρογενικά οξέα (CGA), θεωρείται ότι είναι οι κύριοι συντελεστές στην αντιοξειδωτική δράση του ροφήματος καφέ, που ακολουθούνται από τις μελανοΐδινες, οι οποίες είναι τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard. Επιπλέον, χαμηλού μοριακού βάρους, πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος καφέ, μπορεί επίσης να συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση του ροφήματος καφέ (Perrone, Farah & C. M. Donangelo 2012).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση ψημένων και άψητων κόκκων από τα δυο είδη καφέ (*Coffea arabica* & *Coffea canephora*) όσο και διαφορετικών χρόνων καβουρδίσματος, στην ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικά και Μέθοδοι

Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

K_2HPO_4

H_2O_2

KH_2PO_4

Na_2HPO_4

EDTA

Tris-HCl

XO

Pyrogallol

Xanthine

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο HITACHI UV/VIS Spectrophotometer U-1900.

3.2 Εκχυλίσματα

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από 9 δείγματα καφέ: πέντε Brazil, δυο Robusta και δυο ντεκαφεϊνέ οι οποίοι ήταν μίγμα διαφόρων Arabica.

Τα πέντε Brazil είναι τα εξής:

- 1) Brazil Green (άψητος)
- 2) Brazil Roasted 1 (7.15min, 215°C)
- 3) Brazil Roasted 2 (6.05min, 215°C)
- 4) Brazil Roasted 3 (5.32min, 215°C)
- 5) Brazil Roasted 4 (3.52min, 215°C)

Τα δύο Robusta:

- 6) Robusta Green (άψητος)
- 7) Robusta Roasted (6min, 218°C)

Και τα δυο Ντεκαφεϊνέ:

- 8) Espresso Swiss Water Decaf Green
- 9) Espresso Swiss Water Decaf Roasted (6min, 208°C)

Για την ετοιμασία των εκχυλισμάτων καφέ, από κάθε ποικιλία καφέ ζυγίζονται 2g κόκκοι καφέ οι οποίοι με τη βοήθεια υγρού αζώτου σπάζονται σε γουδί έως ότου γίνουν σκόνη. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε falcon το οποίο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 20ml (10% w/v). Τα falcon τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, ώστε να προστατευθούν οι φωτοευαίσθητες πολυφαινόλες που υπάρχουν στον καφέ, και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο. Έπειτα, το κάθε falcon μαζί με πάγο τοποθετείται σε sonicator για 20 λεπτά (0,7s κύκλος, 75% amplitude). Μετά το πέρας 10 λεπτών, γίνεται παύση, ανάδευση και ακολουθούν τα άλλα 10 λεπτά. Το περιεχόμενο του falcon μεταφέρεται σε beaker και ακολουθεί ανάδευση υπό θέρμανση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε falcon καλυμμένο με αλουμινόχαρτο και αφού πέσει η θερμοκρασία του φυγοκεντρείται στα 3000rpm, στους 5°C για 10 λεπτά και έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρεται σε erpendorf (aliquotstτων 200μl) και αυτά φυλάσσονται στους -80°C.

3.3 Προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

Ανθρώπινο ολικό αίμα συλλέγεται σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυγοκεντρείται για 10 min στα 1370 g, στους 4°C. Το πλάσμα απομακρύνεται και ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων που βρίσκονται στο ίζημα με προσθήκη 1:1 (v/v) απιονισμένου νερού. Τα ερυθροκύτταρα ανακινούνται βίαια και φυγοκεντρούνται για 15 min στα 4020 g, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποτελεί το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Red blood cell lysate, RBCL). Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L). Από 10 mL ολικού αίματος απομονώνονται περίπου 4-5 mL ερυθροκυτταρικού αιμολύματος.

3.4 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

Αρχή μεθόδου

Η ΧΟ καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Olson et al., 1974). Η δραστηριότητα της ΧΟ προσδιορίζεται μέσω της παραγωγής του ουρικού οξέος με βάση τη μέθοδο των Veskoukis et al. (Veskoukis et al., 2006; Prajda&Weber, 1975). Η μεταβολή στον ρυθμό παραγωγής του ουρικού οξέος παρουσία της ξανθίνης και ενός προς μελέτη δείγματος (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) επιτρέπει τη δυνατότητα παρατήρησης της δράσης επαγωγών ή αναστολέων στην δραστηριότητα της ΧΟ.

Το μείγμα της αντίδρασης (1 mL) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου 33 mM, pH 7.5 με EDTA 0.1 mM, ξανθίνη (50 μ M) και εκχύλισμα καφέ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινούσε αμέσως μετά την προσθήκη 33 μ L οξειδάσης της ξανθίνης (0,015 U/mL αραιωμένο σε buffer) (Πίνακας 3). Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Ο ρυθμός παραγωγής του ουρικού οξέος προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 295nm για 4 min. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν. Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται από την αύξηση της αρχικής οπτικής απορρόφησης (παραγωγή του ουρικού οξέος) που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη της ΧΟ. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο Οξειδάσης Ξανθίνης

	Control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Εκχύλισμα	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Ρυθμιστικό	634μl	584μl	584μl	584μl	584μl	584μl
Ξανθίνη	333μl	333μl	333μl	333μl	333μl	333μl
ΧΟ	33μl	33μl	33μl	33μl	33μl	33μl
Τελ. Όγκος	1 ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

3.5 ΚΑΤΑΛΑΣΗ

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της CAT έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi(Aebi, 1984).Η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο. Η μεταβολή στον ρυθμό διάσπασης του H₂O₂ παρουσία καταλάσης και ενός δείγματος (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) επιτρέπει την παρατήρηση της δράσης επαγωγέων ή αναστολέων στην δραστικότητα της CAT(Halliwell&Gutteridge, 2007).

Το μείγμα της αντίδρασης (3 mL) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM, pH 7.4, αιμόλυμα (1:10 v/v) και εκχύλισμα καφέ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 10 min στους 37°C. Η αντίδραση ξεκινούσε αμέσως μετά την προσθήκη 5 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% (Πίνακας 4). Ο ρυθμός κατανάλωσης του H₂O₂ προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 240 nm για 2 min. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται από την μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H₂O₂. Η συγκέντρωση 30 mM του H₂O₂ επιλέχθηκε ως η συγκέντρωση υποστρώματος που η CAT αρχίζει να δρα με τη μέγιστη ταχύτητα.

Πίνακας 4: Πρωτόκολλο Καταλάσης

	Control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Ρυθμιστικό	2991μl	2941μl	2941μl	2941μl	2941μl	2941μl
Εκχύλισμα	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
RBL	4μl	4μl	4μl	4μl	4μl	4μl
H ₂ O ₂	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl	5μl
Τελ. Όγκος	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

3.6 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ

Αρχή Μεθόδου

Μελέτη της επίδρασης στη δραστικότητα της SOD

Η SOD καταλύει τη μετατροπή των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 και O_2 . Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD έγινε με βάση την μέθοδο του Dieterich et al. (2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης από ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος $O_2^{\bullet-}$ που βρίσκονται στον αέρα. Η πυρογαλλόλη, $C_6H_3(OH)_3$, είναι μια τριυδροξυφαινόλη η οποία όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$ (Gao et al., 1998). Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SOD βασίζεται στην αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης λόγω μετατροπής των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 από την SOD. Η μεταβολή του ρυθμού αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία της SOD και ενός δείγματος (π.χ. φυτικό εκχύλισμα) επιτρέπει την παρατήρηση της δράσης επαγωγών ή αναστολέων στην δραστικότητα της SOD.

Για την παρατήρηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της SOD η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL. Στον όγκο αυτό, περιέχονται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM και EDTA 1 mM (pH 8,2), ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα 0,8 mM (αραιωμένο 1:10 v/v) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις (Πίνακας 5). Τα δείγματα που περιέχουν μόνο το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη 100 μL διαλύματος πυρογαλλόλης (0,8 mM) στα δείγματα και ακολουθεί

μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης 420 nm για 3 min. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται από την μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη της πυρογαλλόλης. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η συγκέντρωση 0,8 mM της πυρογαλλόλης επιλέχθηκε ως η συγκέντρωση που η SOD αναστέλλει την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης με τη μέγιστη ταχύτητα.

Επειδή βιοδραστικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων, όπως είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ (Cos et al., 1998) δοκιμάζεται και η επίδραση των εκχυλισμάτων στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD. Η επίδραση στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης φαίνεται με την μείωση της διαφοράς της οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα σε σύγκριση με την μεταβολή του αρνητικού μάρτυρα που αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα και την πυρογαλλόλη. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις διπλούν.

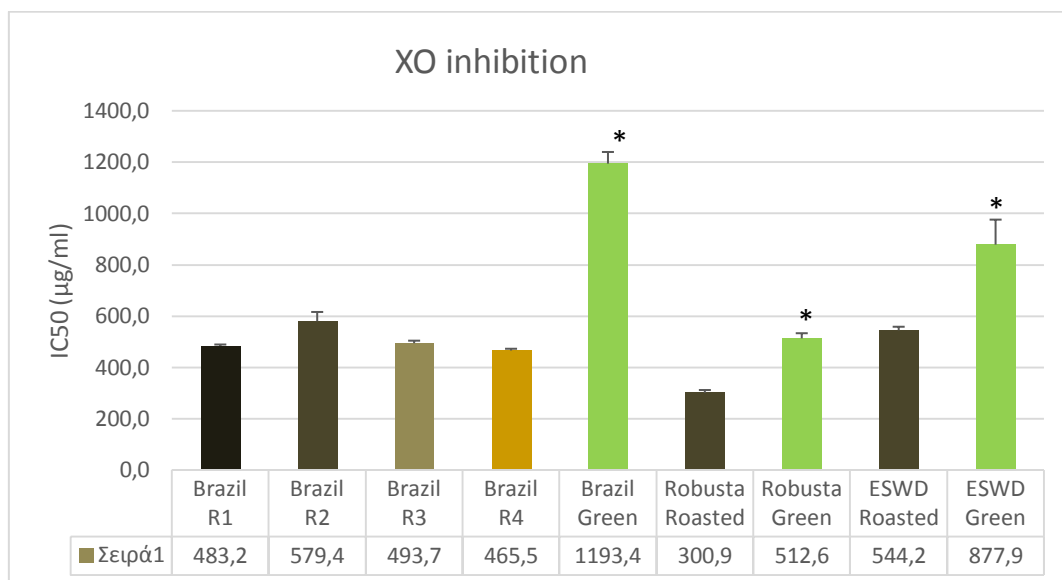
Πίνακας 5: Πρωτόκολλο Οξειδάσης της Ξανθίνης

	Blank	Control	Δείγμα	2η σειρά
Buffer	900 μl	870 μl	770 μl	800 μl
Καφέες	-	-	100 μl	100μl
RBL	-	30 μl	30 μl	-
πυρογαλλόλη	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl

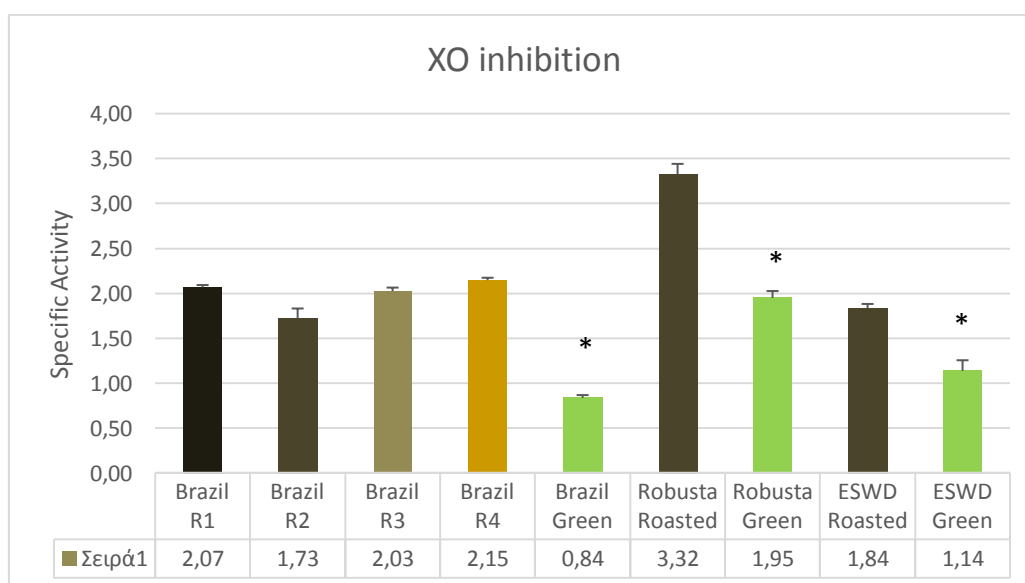
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα από τις πειραματικές μετρήσεις εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:

4.1 ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

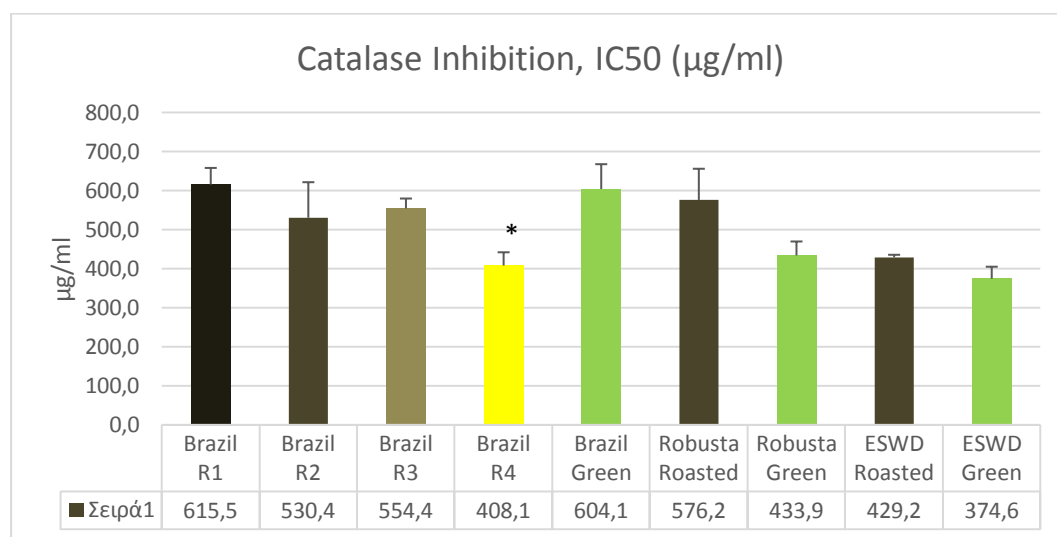


Σε αυτό το διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα του IC₅₀. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$), ενώ αξίζει να αναφερθεί πως οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των καβουρδισμένων δειγμάτων με τα αντίστοιχα πράσινα. Στους πράσινους καφέδες χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση για να επιτευχθεί η αναστολή σε σχέση με τους ψημένους.

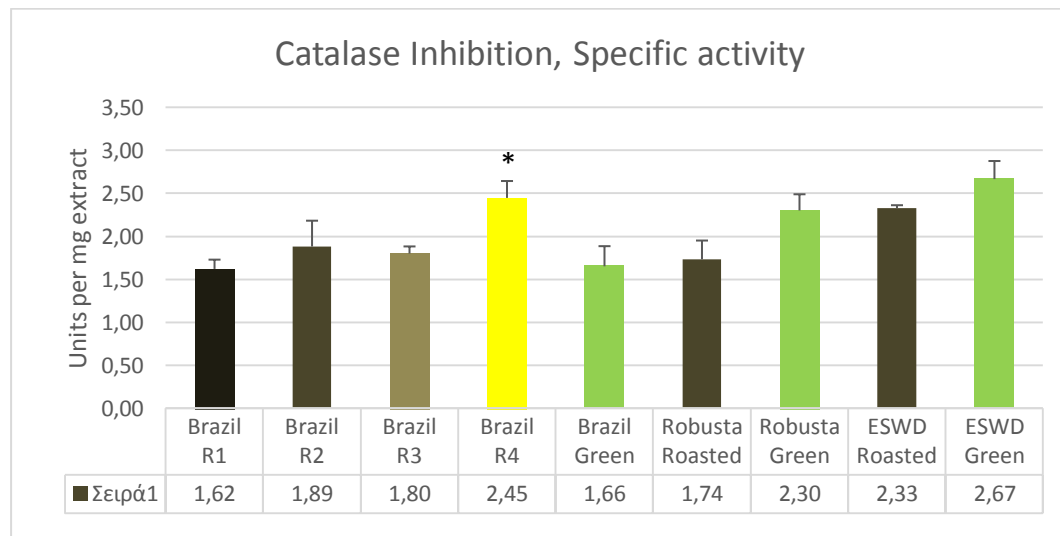


Από τα διαγράμματα προκύπτει πως το καβούρδισμα του καφέ οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της οξειδάσης ξανθίνης, μετο specific activity να κυμαίνεται από 0,84 ως 3,32. Αναλυτικότερα, στο Brazil παρατηρήθηκε αύξηση ενεργότητας κατά 155,9 % από τον πράσινο στον R4 που είναι το λιγότερο ψημένο δείγμα. Εν συνεχεία έπεσε αναλογικά με το χρόνο ψησίματος μέχρι το δείγμα R2 (105.9%) ενώ αυξήθηκε πάλι στον R1 (146.4%). Στον ψημένο Robusta που είναι και το ισχυρότερο εκχύλισμα, παρατηρούμε αύξηση ενεργότητας 70,2 % σε σχέση με τον πράσινο ενώ και στο ψημένο ESWD έχουμε αύξηση ενεργότητας 61,4 % σε σχέση με τον πράσινο. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$), ενώ αξίζει να αναφερθεί πως οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των καβουρδισμένων δειγμάτων με τα αντίστοιχα πράσινα.

4.2 ΚΑΤΑΛΑΣΗ



Σε αυτό το διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα IC50. Το αστεράκι υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$), ενώ αξίζει να αναφερθεί πως οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των καβουρδισμένων δειγμάτων με τα αντίστοιχα πράσινα. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ πράσινων και ψημένων καφέδων στους Robusta και ESWD. Με εξαίρεση τον R4 που χρειάζεται μικρότερη συγκέντρωση για να επιτευχθεί η αναστολή σε σχέση με τον πράσινο Brazil.



Από αυτό το διάγραμμα προκύπτει πως στους Robusta και ESWD δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ψημένου και άψητου, ενώ στον Brazil έχουμε διαφορά μόνο μεταξύ του πράσινου και του R4. Στον R4 αυξάνεται η αναστολή της καταλάσης κατά 47,6 % σε σχέση με τον πράσινο. Στα εναπομείναντα 3 δείγματα, φάνηκε πως το περαιτέρω ψήσιμο οδήγησε σε μείωση της ικανότητας αναστολή της καταλάσης στα ίδια επίπεδα με το εκχύλισμα πράσινου καφέ. Το αστεράκι υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$), ενώ αξίζει να αναφερθεί πως οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των καβουρδισμένων δειγμάτων με τα αντίστοιχα πράσινα.

4.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ

Όλα τα δείγματα καφέδων δεν είχαν καμία απολύτως επίδραση στην δραστικότητα του ενζύμου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δραστηριότητα του καφέ. Ο καφές είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως λόγω των χαρακτηριστικών οργανοληπτικών στοιχείων του. Ως φυτικά προϊόντα, οι κόκκοι καφέ είναι πλούσιοι σε βιοδραστικά συστατικά, μεταξύ των οποίων η καφεΐνη, κάποια διτερπένια και πολυφαινολικά μόρια με κυριότερα τα χλωρογενικά οξέα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του καφέ είναι η επεξεργασία που υφίστανται οι κόκκοι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του ροφήματος. Αναλυτικότερα, οι κόκκοι καβουρδίζονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πολλές φορές υπερβαίνουν τους 200°C) και για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα αναλόγως του επιθυμητού τύπου ροφήματος. Με την ανάπτυξη τόσο υψηλών θερμοκρασιών πραγματοποιούνται διεργασίες εντός του κόκκου που αλλάζουν τη φυσικοχημική του σύσταση, με σημαντικότερες τις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης τύπου Maillard. Αυτές οι αντιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται μελανοΐδινες. Τα μόρια αυτά πιθανώς εμφανίζουν βιοδραστικότητα, προσδίδοντας στον καβουρδισμένο κόκκο διαφορετικές ιδιότητες από τον πράσινο.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για το ρόφημα του καφέ κι ενώ κάποιες έδειξαν ευεργετικά για την υγεία αποτελέσματα, σε άλλες αυτά δεν ήταν εμφανή (Frost-Meyer & Logomarsino 2012; Natella et al. 2007). Οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν είτε απευθείας χορήγηση του ροφήματος σε ανθρώπους είτε *in vitro* πειράματα που μελετούσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα για το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τόσο καβουρδισμένοι όσο και πράσινοι κόκκοι ως προς την επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα της οξειδάσης τα ξανθίνης, της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του καφέ. Η οξειδάση της ξανθίνης επιλέχθηκε καθώς είναι ένα ένζυμο που δυνητικά μπορεί να προκαλέσει υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (πχ ισχαιμία-επαναιμάτωση κατά την έντονη άσκηση). Τα άλλα δυο ένζυμα (Καταλάση, Υπεροξειδική Δισμουτάση) συμμετέχουν στην αποτοξικοποίηση των παραγόμενων ριζών και θα ήταν ενδιαφέρον να δειχθεί η πιθανή επίδραση του καφέ στη δραστηριότητα τους.

Αρχικά, παρήχθησαν τα εκχυλίσματα καφέ. Συνολικά εξετάστηκαν εννέα δείγματα καφέ που προέρχονται από τα είδη Arabica και Robusta. Από αυτά τα δείγματα, τρία προέρχονταν από πράσινους κόκκους και τα υπόλοιπα έξι από καβουρδισμένους καθώς σε μια ποικιλία εξετάστηκαν τέσσερα διαφορετικά καβουρδίσματα.

Το επόμενο βήμα ήταν ο υπολογισμός του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων, καθώς οι πολυφαινόλες είναι από τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν τα φυτικά προϊόντα. Το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε παράλληλη μελέτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το TPC μειώθηκε σημαντικά στους καβουρδισμένους κόκκους τόσο στην ποικιλία Robusta όσο και στον Espresso SWD. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε και στον Brazil, ωστόσο σε αυτή την περίπτωση το πράσινο δείγμα είχε χαμηλότερο ποσοστό πολυφαινολών σε σχέση με το ελαφρύτερα καβουρδισμένο δείγμα (Brazil R4). Η παρατηρούμενη μείωση του TPC ήταν αναμενόμενη με βάση τη βιβλιογραφία καθώς μόρια όπως τα χλωρογενικά οξέα είναι ευαίσθητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας όπως η μεγάλη αύξηση κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος. Χαρακτηριστικά έχει βρεθεί πως περίπου 7-8% των χλωρογενικών οξέων καταστρέφεται για κάθε λεπτό καβουρδίσματος (Gawlik-Dziki et al. 2014).

Με βάση τα αποτελέσματα, φάνηκε πως ο καφές μπορεί να μειώσει την δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και της Καταλάσης σε παρόμοια επίπεδα ενώ δεν έχει καμία επίδραση στην Υπεροξειδική Δισμουτάση.

Αναλυτικότερα, στην οξειδάση της ξανθίνης όλα τα υπό εξέταση εκχυλίσματα οδήγησαν σε μείωση δραστηριότητας της. Αυτό επετεύχθη σε συγκεντρώσεις από 301.5 - 1193.5 $\mu\text{g/ml}$ (IC50) που αντιστοιχούν σε τιμές Specific Activity (με βάση και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο) από 0.84 έως 3.32. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν πως όλα τα ψημένα δείγματα εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της ικανότητας αναστολής σε σχέση με τα αντίστοιχα πράσινα. Πιο συγκεκριμένα, στο Brazil παρατηρήθηκε αύξηση ενεργότητας κατά 155,9 % από τον πράσινο στον R4 που είναι το λιγότερο ψημένο δείγμα. Εν συνεχεία έπεσε αναλογικά με το χρόνο ψησίματος μέχρι το δείγμα R2 (105.9%) ενώ αυξήθηκε πάλι στον R1 (146.4%). Στον ψημένο Robusta που είναι και το ισχυρότερο εκχύλισμα, παρατηρούμε αύξηση ενεργότητας 70,2 % σε σχέση με τον πράσινο ενώ και στο ψημένο ντεκαφεϊνέ έχουμε αύξηση ενεργότητας 61,4 % σε σχέση με τον πράσινο. Η απουσία καφεΐνης δεν επηρεάζει την ικανότητα αναστολής της οξειδάσης

της ξανθίνης καθώς τα δυο ντεκαφεϊνέ δείγματα ανέστειλαν το ένζυμο σε παρεμφερείς συγκεντρώσεις με τα υπόλοιπα δείγματα.

Όσον αφορά την Καταλάση και πάλι όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα αναστολής και μάλιστα σε παρόμοια επίπεδα συγκέντρωσης με την οξειδάση της ξανθίνης. Αναλυτικότερα, οι τιμές IC50 κυμαίνονταν από 408.1 - 615.5 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχούν σε τιμές Specific Activity από 1.62-2.45. Στα δείγματα Robusta και ντεκαφεϊνέ δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ψημένου και άψητου καφέ, ενώ στον Brazil έχουμε διαφορά μόνο μεταξύ του πράσινου και του R4, όπου και αυξάνεται η αναστολή της καταλάσης κατά 47,6 % σε σχέση με τον πράσινο. Το δείγμα Brazil R4 ήταν και το πιο δραστικό καθώς είχε την χαμηλότερη τιμή IC50 και αντίστοιχα την υψηλότερη τιμή Specific Activity. Στα εναπομείναντα 3 δείγματα, φάνηκε πως το περαιτέρω ψήσιμο οδήγησε σε μείωση της ικανότητας αναστολής της καταλάσης στα ίδια επίπεδα με το εκχύλισμα πράσινου καφέ. Και σε αυτό το ένζυμο τα αποτελέσματα δείχνουν πως η απουσία καφεΐνης δεν επηρέασε την ικανότητα αναστολής της καταλάσης.

Το τρίτο υπό μελέτη ένζυμο, η Υπεροξειδική Δισμουτάση δεν επηρεάστηκε από κανένα δείγμα καφέ.

Στο σύνολο τους, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν πως τα μόρια που περιέχονται τόσο στον άψητο όσο και στον ψημένο καφέ πέραν της καφεΐνης, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τόσο ένα ένζυμο που σχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών όσο και ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο. Η οξειδάση της ξανθίνης φυσιολογικά βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον οργανισμό καθώς το ένζυμο συναντάται στη μορφή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης. Ωστόσο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις όπως σε αυτή της ισχαιμίας προκαλείται η μετατροπή στη μορφή της οξειδάσης. Η οξειδάση, σε αντίθεση με την αφυδρογονάση έχει τη δυνατότητα να παράγει ελεύθερες ρίζες (και πιο συγκεκριμένα ιόν σουπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου) λόγω διαφορετικού μηχανισμού κατάλυσης. Στις περιπτώσεις ισχαιμίας (όπως αυτή που οφείλεται στην πραγματοποίηση έντονης άσκησης) η αφυδρογονάση μετατρέπεται σε οξειδάση η οποία μόλις επέλθει η επαναιμάτωση του ιστού ξεκινάει την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόν της μετατροπής της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Η Οξειδάση της ξανθίνης είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο ωστόσο έχει εντοπιστεί και στην κυκλοφορία του αίματος όπου μάλιστα μπορεί να προσκολληθεί με ισχυρή συγγένεια στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την τοπική παραγωγή ελευθέρων ριζών (μηχανισμός που ίσως

συσχετίζεται με καρδιαγγειακά νοσήματα στα οποία είναι γνωστό πως ενέχεται το οξειδωτικό στρες) (Houston et al. 1999). Η παρατηρούμενη αύξηση αναστολής από τον καβουρδισμένο καφέ πιθανώς να οφείλεται εν μέρει στις παραγόμενες λακτόνες των χλωρογενικών οξέων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που απαιτείται (Honda et al. 2014). Η ικανότητα του καφέ να εμποδίζει την παραγωγή ελευθέρων ριζών λόγω αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης μπορεί να θεωρηθεί θετική καθώς μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης οξειδωτικού στρες στους ιστούς που δρα η οξειδάση. Ωστόσο, στην περίπτωση των μυών, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία πως η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η φλεγμονώδης αντίδραση κατά τη μυϊκή βλάβη στην άσκηση ίσως είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των μυϊκών ινών (Tidball & Villalta 2010; Tidball 2005). Έτσι, ίσως η αναστολή ενός από τους κύριους μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών σε περίπτωση έντονης άσκησης να μην έχει ευεργετικές επιδράσεις ως προς την αναγέννηση του μυϊκού ιστού. Παρόλα αυτά, η αναστολή της οξειδάσης από τον καφέ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση της ουρικής αρθρίτιδας, μιας παθολογικής κατάστασης που παρατηρείται υπερβολική δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου και έχει σαν αποτέλεσμα την εναπόθεση περίσσειας του ουρικού οξέος στις αρθρώσεις (Day et al. 2016).

Ως προς την Καταλάση, η αναστολή της μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις λόγω της μειωμένης ικανότητας αποτοξικοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο δεν είναι αυτό καθ' εαυτό τοξικό ωστόσο δύναται να δώσει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton, η οποία μπορεί να αλληλοεπιδράσει και να προκαλέσει βλάβες στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως σε *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με κατανάλωση καφέ, βρέθηκε πως το ρόφημα προκάλεσε αύξηση ενεργότητας τόσο της Καταλάσης όσο και της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους (Magalhães et al. 2016; Abreu et al. 2011). Τοιούτοτρόπως, φαίνεται πως πέρα από την απ' ευθείας ικανότητα των μορίων του καφέ να αναστέλλουν την Καταλάση, η συνολική επίδραση του ροφήματος σε ζωντανό οργανισμό είναι θετική ως προς το συγκεκριμένο ένζυμο, δείχνοντας πως η βιοδιαθεσιμότητα, ο μεταβολισμός και η πιθανή ικανότητα ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης της Καταλάσης (αλλά και της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης) μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητα του καφέ.

Κλείνοντας, η παρούσα μελέτη έγινε σε συνέχεια προηγούμενων που είχαν καταδείξει την αντιοξειδωτική και DNA-προστατευτική ικανότητα εκχυλισμάτων καφέ. Ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των εκχυλισμάτων επιβεβαιώθηκε και εδώ καθώς αυτά παρουσίασαν την ικανότητα αναστολής της Οξειδάσης της Ξανθίνης. Ωστόσο, μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν πως τα ίδια εκχυλίσματα εμφάνισαν επίσης ικανότητα αναστολής και της Καταλάσης, ενός εκ των κύριων αντιοξειδωτικών ενζύμων σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την πολυπλοκότητα του μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ, κάτι που είναι λογικό καθώς ένα ρόφημα καφέ περιλαμβάνει έως και 1000 διαφορετικά βιομόρια τα οποία πιθανώς εμφανίζουν πληθώρα ιδιοτήτων και βιοδραστικότητας. Επιπροσθέτως, οι δεδομένες μεταβλητές της βιοδιαθεσιμότητας και του ενδογενούς μεταβολισμού μπορούν να επηρεάσουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τη βιοδραστικότητα του καφέ, καθιστώντας απαραίτητη τη διενέργεια πειραμάτων *in vivo* με βάση τα οποία θα μπορούσαν να επιβεβαιωθούν ή να καταρριφθούν τα παρόντα ευρήματα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abreu, R.V. et al., 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), pp.659–664.
- Agardh, E.E. et al., 2004. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *Journal of internal medicine*, 255(6), pp.645–652.
- Akash, M.S.H., Rehman, K. & Chen, S., 2014. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*, 30(7–8), pp.755–763. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713005480>.
- Ames, B., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, pp.3–32.
- Ames, B.N., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, pp.3–32.
- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, 55(1), pp.1–23.
- Bøhn, S.K., Blomhoff, R. & Paur, I., 2014. Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms. *Molecular nutrition & food research*, 58(5), pp.915–30.
- Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T., 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128(1), pp.14–21.
- Brezová, V., Šlebodová, A. & Staško, A., 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114(3), pp.859–868. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608012454> [Accessed January 10, 2015].
- Bulkley, G.B., 1987. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, pp.66–73.
- Carden, D.L. & Granger, D.N., 2000. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*, 190(3), pp.255–266.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Lifesciences*, 65(4), pp.337–353.
- Cavin, C. et al., 2002. 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*, 40(8), pp.1155–1163.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979a. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979b. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Cheeseman, K.H. & Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), pp.481–493.
- Clifford M.N. and Willson K.C. Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverages. *London, Croom Hel.* 1985.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- Davies, K., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp.9895–9901.
- Day, R.O. et al., 2016. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(23), pp.2167–2180.
- Dirks-Naylor, A.J., 2015. The benefits of coffee on skeletal muscle. *Life Sciences*, 143, pp.182–186. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320515300680>.
- Dizdaroglu, M. et al., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine*, 32(11), pp.1102–1115.
- Elsayed, N.M. et al., 1992. Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), pp.153–165.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10),

- pp.872–879. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702009164>.
- Farah, A. et al., 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), pp.374–381.
- Farah, A. et al., 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), pp.373–380.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, L.S., 2008. 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *Journal of Nutrition*, (September), pp.2309–2315.
- Frost-Meyer, N.J. & Logomarsino, J. V., 2012. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(4), pp.819–830. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461200093X> [Accessed January 10, 2015].
- Gawlik-Dziki, U. et al., 2014. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee—mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Research International*, 61, pp.48–55. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691400307X> [Accessed January 10, 2015].
- Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K.J., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), pp.526–534.
- Halliwell, B., 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*, 61, pp.73–101.
- Harborne, J., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
- Hayyan, M., Hashim, M.A. & AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews*, 116(5), pp.3029–3085.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology*, 300, pp.156–166.
- Herrera-Arellano, A. et al., 2004. Clinical trial of Cecropia obtusifolia and Marrubium vulgare leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 11(7–8), pp.561–566.
- Honda, S. et al., 2014. Identification of crypto- and neochlorogenic lactones as potent xanthine oxidase inhibitors in roasted coffee beans. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 78(12), pp.2110–2116.
- Houston, M. et al., 1999. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium: Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), pp.4985–4994.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N. & Morgan, L.M., 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American journal of clinical nutrition*, 78(4), pp.728–733.
- Jones, D.P. et al., 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free radical biology & medicine*, 28(4), pp.625–635.
- Kanner, J. & Lapidot, T., 2001. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free radical biology & medicine*, 31(11), pp.1388–1395.
- Keles, M.S. et al., 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 28(2), pp.141–143.
- Khallouki, F. et al., 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), pp.67–75.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- Larsson, S.C. & Wolk, A., 2007. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis.

- Gastroenterology*, 132(5), pp.1740–1745.
- Lattanzio, V. et al., 2006. *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*.
- Lee, C., 2000. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 295(1–2), pp.141–154.
- Levine, R. & Stadtman, E., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), pp.1495–1502.
- Lijinsky, W., 1999. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation research*, 443(1–2), pp.129–138.
- Lindsay, J. et al., 2002. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American journal of epidemiology*, 156(5), pp.445–453.
- Magalhães, C.S. De et al., 2016. The Coffee Protective Effect on Catalase System in the Preneoplastic Induced Rat Liver. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Manach, C. et al., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.230S–242S.
- Manach, C. et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Maurin, O. et al., 2007. Towards a Phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Annals of Botany*, 100(7), pp.1565–1583.
- Mitchell H.W. Cultivation and Harvesting of the Arabica Coffee Tree. Coffee: Agronomy. Ed. R.J. Clarke. New York: Elsevier Applied Science. 1988
- Monente, C. et al., 2015. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, 12, pp.365–374.
- Moreira, A.S.P. et al., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), pp.903–915. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C2FO30048F>.
- Muller, F. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine*, 43(4), pp.477–503.
- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo (Athens, Greece)*, 13(3), pp.295–309.
- Naito, Y. et al., 1998. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive diseases and sciences*, 43(9 Suppl), p.30S–34S.
- Natella, F. et al., 2007. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 86(3), pp.604–609.
- Obata, T. et al., 2001. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain research*, 906(1–2), pp.170–175.
- Olthof, M. et al., 2001. 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*, 73(3), pp.532–538.
- Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P., 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews*, 29(2), pp.351–378.
- Pellegrini, N. et al., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*, 133(9), pp.2812–2819.
- Pérez-Hernández, L.M. et al., 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from Coffea arabica and Coffea canephora. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), pp.430–435.
- Perrone, D., Farah, A. & Donangelo, C., 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), pp.4265–4275.
- Perrone, D., Farah, A. & Donangelo, C.M., 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(17), pp.4265–4275.

- Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp.55–74.
- Prior, R.L. & Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology & medicine*, 27(11–12), pp.1173–1181.
- Quideau, S. et al., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Ray, R.S. et al., 2001. Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug and chemical toxicology*, 24(2), pp.191–200.
- Reiter, R.J. et al., 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18(1), pp.1–11.
- Reiter, R.J., Carneiro, R.C. & Oh, C.S., 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 29(8), pp.363–372.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Rodrigues, N.P., Salva, T.D.J.G. & Bragagnolo, N., 2015. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the in Vitro Capacity To Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(19), pp.4815–4826.
- Salazar-Martinez, E. et al., 2004. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 140(1), pp.1–8.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S., 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 5(3), pp.237–245.
- Steinbacher, P. & Eckl, P., 2015. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules*, 5(2), pp.356–377.
- Tidball, J.G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R345–53.
- Tidball, J.G. & Villalta, S.A., 2010. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(5), pp.R1173–87.
- Trugo, L.C. & Macrae, R., 1984. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15(3), pp.219–227.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40.
- Vitaglione, P., Fogliano, V. & Pellegrini, N., 2012. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food & Function*, 3(9), p.916.
- Wattenberg, L., 1983. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer research*, 43(5 Suppl), p.2448s–2453s.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), pp.139–162.
- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I. Δραστικές ρίζες οξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακες τιμών απορροφήσεων της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Πίνακας 6: Brazil Green

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,516	1,519	1,521	1,524	control1	1,52	1,525	1,527	1,528
	1,523	1,527	1,529	1,533	control2	1,532	1,534	1,534	1,534
	1,528	1,532	1,535	1,537	control3	1,486	1,492	1,494	1,496
C2					blank1	-0,201	-0,102	-0,019	0,03
	1,538	1,54	1,542	1,544	blank2	-0,192	-0,075	0,005	0,049
	0,819	0,82	0,821	0,822					
	1,514	1,518	1,519	1,521					
C3					C1	0'	1'	2'	3'
	1,53	1,532	1,538	1,539		-0,183	-0,071	0,007	0,056
	0,93	0,931	0,931	0,931		-0,167	-0,053	0,023	0,069
	1,505	1,508	1,51	1,511	C2	-0,15	-0,032	0,052	0,092
						-0,147	-0,028	0,05	0,097
C4					C3	-0,102	0,019	0,09	0,139
	1,506	1,509	1,511	1,514		-0,098	0,022	0,102	0,149
	1,5	1,502	1,505	1,506	C4	-0,003	0,126	0,19	0,238
						-0,005	0,118	0,199	0,244
C5					C5	0,197	0,307	0,382	0,426
	1,526	1,529	1,531	1,533		0,202	0,319	0,391	0,436
	0,976	0,983	0,991	0,991					

Πίνακας 7: Brazil R1

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,772	1,775	1,78	1,786	control1	1,767	1,771	1,777	1,778
	1,745	1,751	1,758	1,763	control2	1,794	1,804	1,81	1,813
	1,792	1,801	1,806	1,807	control3	1,762	1,767	1,772	1,773
C2	1,802	1,811	1,812	1,815	blank1	-0,144	-0,024	0,046	0,095
	1,804	1,808	1,813	1,816	blank2	-0,141	-0,022	0,058	0,101
	1,796	1,804	1,808	1,811					
						0'	1'	2'	3'
C3	1,773	1,776	1,78	1,782	C1	-0,082	0,032	0,107	0,154
	1,804	1,808	1,811	1,815		-0,084	0,029	0,104	0,152
	1,806	1,81	1,813	1,816	C2	-0,013	0,094	0,169	0,216
						-0,031	0,085	0,159	0,208
C4	1,823	1,827	1,828	1,834	C3	0,084	0,194	0,271	0,32
	1,823	1,829	1,831	1,834		0,085	0,195	0,271	0,319
	1,766	1,772	1,775	1,776	C4	0,246	0,354	0,427	0,473
						-0,052	0,067	0,147	0,194
C5	1,816	1,818	1,82	1,821	C5	0,568	0,67	0,738	0,78
	1,829	1,833	1,835	1,838		0,562	0,665	0,736	0,777
	1,812	1,818	1,817	1,819					

Πίνακας 8: Brazil R2

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,792	1,797	1,803	1,805	control1	1,711	1,718	1,722	1,727
	1,803	1,809	1,814	1,817	control2	1,41	1,413	1,414	1,415
					control3	1,79	1,798	1,801	1,808
C2					blank1	-0,169	-0,064	0,009	0,057
	1,737	1,746	1,748	1,749	blank2	-0,174	-0,078	0	0,048
	1,802	1,805	1,812	1,816					
	1,593	1,629	1,656	1,677		0'	1'	2'	3'
C3					C1	-0,14	-0,044	0,028	0,077
	1,793	1,798	1,806	1,81		-0,144	-0,049	0,023	0,072
	1,807	1,806	1,813	1,815	C2	-0,097	0,001	0,069	0,116
						-0,097	0,008	0,077	0,126
C4					C3	-0,028	0,075	0,147	0,195
	1,797	1,802	1,806	1,811		-0,028	0,07	0,143	0,192
	1,809	1,812	1,814	1,82	C4	0,085	0,181	0,25	0,297
						0,087	0,186	0,252	0,298
C5					C5	0,328	0,419	0,484	0,527
	1,758	1,762	1,765	1,768		0,344	0,438	0,508	0,553
	1,822	1,827	1,827	1,829					

Πίνακας 9: Brazil R3

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,787	1,792	1,796	1,8	control1	1,787	1,79	1,794	1,798
	1,717	1,731	1,738	1,745	control2	1,788	1,793	1,798	1,8
	1,798	1,802	1,804	1,807	control3	1,775	1,783	1,788	1,79
C2	1,788	1,794	1,799	1,801	blank1	-0,011	0,09	0,161	0,209
	1,783	1,804	1,806	1,807	blank2	-0,017	0,084	0,153	0,201
	1,781	1,787	1,792	1,795					
						0'	1'	2'	3'
					C1	0,012	0,111	0,182	0,231
C3	1,789	1,796	1,798	1,802		0,002	0,106	0,182	0,231
	1,794	1,8	1,802	1,805					
	1,806	1,808	1,808	1,812	C2	0,03	0,137	0,214	0,261
						0,03	0,137	0,218	0,262
C4	1,726	1,732	1,733	1,734	C3	0,081	0,189	0,263	0,311
	1,8	1,812	1,814	1,817		0,088	0,194	0,268	0,316
	1,793	1,797	1,802	1,804					
					C4	0,187	0,291	0,365	0,412
						0,19	0,295	0,368	0,416
C5	1,787	1,792	1,794	1,798					
	1,799	1,804	1,806	1,81	C5	0,412	0,509	0,577	0,621
	1,809	1,813	1,818	1,82		0,423	0,524	0,59	0,634

Πίνακας 10: Brazil R4

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,91	1,927	1,942	1,946	control1	1,71	1,728	1,736	1,742
	1,806	1,82	1,827	1,831	control2	1,543	1,553	1,556	1,56
	1,846	1,87	1,882	1,887	control3	1,728	1,746	1,756	1,76
C2					blank1	-0,006	0,165	0,239	0,274
	1,912	1,929	1,935	1,944	blank2	0,008	0,096	0,213	0,27
	1,627	1,641	1,649	1,654					
	1,879	1,897	1,902	1,908		0'	1'	2'	3'
C3					C1	0,022	0,184	0,262	0,298
	1,921	1,938	1,948	1,953		0,019	0,183	0,263	0,3
	1,925	1,94	1,95	1,955	C2	0,046	0,199	0,275	0,313
						0,034	0,195	0,277	0,313
C4					C3	0,073	0,228	0,305	0,341
	1,909	1,926	1,933	1,937		0,06	0,223	0,303	0,34
	1,888	1,893	1,898	1,8	C4	0,122	0,281	0,361	0,398
						0,128	0,284	0,364	0,4
C5					C5	0,229	0,382	0,46	0,498
	1,862	1,878	1,886	1,88		0,24	0,394	0,472	0,51
	1,808	1,866	1,897	1,918					

Πίνακας 11: ESWD Green

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,525	1,528	1,532	1,534	control1	1,52	1,525	1,526	1,53
	1,452	1,454	1,458	1,46	control2	1,359	1,361	1,362	1,363
	1,5	1,503	1,507	1,508	control3	1,538	1,542	1,544	1,545
C2					blank1	-0,178	-0,076	-0,004	0,045
	1,505	1,507	1,509	1,512	blank2	-0,166	-0,065	0,009	0,059
	1,453	1,454	1,457	1,459					
	1,498	1,512	1,515	1,518		0'	1'	2'	3'
C3					C1	-0,144	-0,041	0,032	0,08
	1,539	1,544	1,547	1,551		-0,142	-0,038	0,038	0,087
	1,439	1,443	1,446	1,447	C2	-0,122	-0,016	0,063	0,109
	1,522	1,526	1,532	1,534		-0,116	-0,009	0,067	0,117
C4					C3	-0,063	0,038	0,111	0,159
	1,52	1,525	1,526	1,527		-0,079	0,027	0,107	0,157
	1,524	1,527	1,53	1,531	C4	0,01	0,116	0,191	0,24
	1,509	1,515	1,517	1,519		0,003	0,102	0,167	0,211
C5					C5	0,162	0,255	0,319	0,361
	1,397	1,4	1,402	1,403		0,172	0,274	0,348	0,396
	1,318	1,32	1,32	1,322					
	1,547	1,55	1,551	1,553					

Πίνακας 12: ESWD Roasted

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,316	1,331	1,336	1,337	control1	1,528	1,53	1,532	1,537
	1,26	1,265	1,266	1,266	control2	1,378	1,38	1,381	1,382
	1,252	1,254	1,26	1,262	control3	1,363	1,367	1,369	1,369
C2					blank1	-0,162	-0,051	0,034	0,082
	1,514	1,52	1,523	1,526	blank2	-0,147	-0,032	0,051	0,101
	1,543	1,547	1,55	1,551					
	1,539	1,542	1,543	1,549		0'	1'	2'	3'
C3					C1	-0,125	-0,014	0,064	0,113
	1,523	1,525	1,529	1,53		-0,146	-0,031	0,048	0,097
	1,535	1,538	1,541	1,543	C2	-0,131	-0,015	0,064	0,113
	1,504	1,509	1,511	1,512		-0,121	-0,01	0,067	0,115
C4					C3	-0,094	0,017	0,098	0,146
	1,521	1,525	1,529	1,531		-0,098	0,016	0,093	0,14
	1,552	1,556	1,56	1,562	C4	-0,027	0,082	0,163	0,207
	1,521	1,525	1,529	1,532		-0,03	0,082	0,161	0,212
C5					C5	0,109	0,215	0,287	0,332
	1,514	1,515	1,517	1,518		0,11	0,216	0,291	0,338
	1,68	1,682	1,683	1,684					

Πίνακας 13: Robusta Green

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,873	1,875	1,879	1,884	control1	1,87	1,877	1,882	1,886
	1,867	1,873	1,878	1,89	control2	1,87	1,872	1,879	1,882
	1,872	1,878	1,891	1,896	control3	1,862	1,868	1,874	1,876
C2	1,836	1,868	1,872	1,875	blank1	-0,102	0,003	0,075	0,125
	1,862	1,867	1,87	1,878	blank2	-0,097	0,014	0,091	0,141
	1,876	1,879	1,885	1,887					
						0'	1'	2'	3'
					C1	-0,075	0,029	0,106	0,157
C3	1,869	1,874	1,879	1,881		-0,066	0,04	0,119	0,168
	1,872	1,877	1,881	1,884					
	1,871	1,876	1,88	1,882	C2	-0,046	0,062	0,139	0,188
						-0,041	0,066	0,142	0,191
C4	1,87	1,873	1,876	1,881	C3	0,004	0,118	0,188	0,238
	1,872	1,877	1,881	1,884		0,008	0,115	0,192	0,242
	1,881	1,888	1,891	1,894	C4	0,108	0,222	0,295	0,344
						0,11	0,213	0,291	0,34
C5	1,881	1,883	1,888	1,891					
	1,887	1,891	1,895	1,898	C5	0,308	0,411	0,486	0,534
	1,606	1,609	1,618	1,619		0,309	0,413	0,487	0,534

Πίνακας 14: Robusta Roasted

C1	0'	1'	2'	3'		0'	1'	2'	3'
	1,836	1,842	1,845	1,848	control1	1,676	1,693	1,701	1,702
	1,944	1,946	1,955	1,959	control2	1,933	1,94	1,946	1,95
	1,933	1,94	1,945	1,951	control3	1,936	1,942	1,946	1,95
C2					blank1	-0,011	0,103	0,184	0,238
	1,928	1,936	1,94	1,943	blank2	-0,003	0,121	0,202	0,25
	1,501	1,517	1,524	1,527					
	1,836	1,84	1,844	1,846		0'	1'	2'	3'
C3					C1	0,018	0,14	0,229	0,272
	1,734	1,74	1,74	1,741		0,016	0,143	0,223	0,271
	1,936	1,94	1,949	1,951	C2	0,044	0,167	0,248	0,294
	1,938	1,945	1,947	1,95		0,049	0,174	0,256	0,302
C4					C3	0,083	0,206	0,296	0,334
	1,943	1,948	1,951	1,953		0,088	0,212	0,292	0,338
	1,951	1,956	1,958	1,989	C4	0,185	0,306	0,383	0,428
C5						0,18	0,3	0,379	0,425
	1,956	1,964	1,966	1,971	C5	0,362	0,473	0,546	0,59
	1,948	1,953	1,956	1,962		0,378	0,492	0,565	0,608
	1,945	1,951	1,953	1,96					