



**ΣΟΥΡΣΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

Λάρισα, 2018

**Μελέτη επίδρασης καφέ  
στην οξειδοαναγωγική  
κατάσταση επίμυων**

**Coffee administration  
effect in rat redox  
status**

## Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- ❖ Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
  
- ❖ Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
  
- ❖ Αμούτζιας Γρηγόριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα καθώς η πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψή του στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Η βοήθεια που μου προσέφερε στην ανάθεση του θέματος και στην οργάνωση της πειραματικής πορείας ήταν καθοριστικής σημασίας για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια του κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την στήριξη, τη βοήθεια και το φιλικό περιβάλλον που μου προσέφεραν τους μήνες που δούλεψα μαζί τους. Κυρίως, όμως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για τον χρόνο που διέθεσε καθώς και για την καθοριστικής σημασίας βοήθεια του στην εκτέλεση των πειραμάτων αλλά και τη συγγραφή της εργασίας μου.

## Περιεχόμενα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή .....	2
Ευχαριστίες .....	3
Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη .....	7
Abstract .....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Ο καφές .....	9
1.2 Πολυφαινόλες.....	10
1.3 Ελεύθερες Ρίζες.....	11
1.4 Δραστικές μορφές .....	12
1.4.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) .....	12
1.4.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).....	12
1.5 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	13
1.6 Κατάσταση οξειδωτικού στρες .....	14
1.7 Διαταραχές λόγω οξειδωτικού στρες .....	15
1.8 Ευεργετικές επιδράσεις λόγω οξειδωτικού στρες.....	16
1.9 Αντιοξειδωτική άμυνα.....	17
1.9.1 Γενικά.....	17
1.9.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά .....	18
1.9.3 Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	19
1.10 Κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	20
1.10.1 Καταλάση (Catalase/CAT) .....	20
1.10.2 Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) .....	21
1.10.3 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (γ-GCL) .....	22

1.10.4	Περοξειεδοξίνες.....	22
2.	Σκοπός.....	23
3.	Υλικά και μέθοδοι.....	23
3.1	Χορήγηση καφέ σε αρουραίους και συλλογή ιστών.....	23
3.1.1	Χορήγηση καφέ .....	23
3.1.2	Συλλογή αίματος και ιστών .....	23
3.2	Επεξεργασία αίματος και ομογενοποίηση ιστών .....	24
3.2.1	Επεξεργασία αίματος .....	24
3.2.2	Ομογενοποίηση ιστών.....	25
3.3	Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης .....	25
3.3.1	Γενικά.....	25
3.3.2	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	25
3.3.3	Μέτρηση Γλουταθειόνης .....	26
3.3.4	Ικανότητα διάσπασης H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	27
3.3.5	Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) .....	28
3.3.6	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	30
3.3.7	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια .....	31
3.4	Western-blot analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ-GCL, SOD-1 και CAT .....	33
3.5	Real-time PCR (sod1, gclc, cat) .....	35
3.5.1	Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA.....	35
3.5.2	Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων .....	35
3.6	Στατιστική Ανάλυση .....	36
4.	Αποτελέσματα.....	37
4.1	Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης .....	37
4.1.1	Πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	37
4.1.2	Ιστοί (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ).....	38

4.2	Real-time PCR (sod1, gclc, cat).....	41
4.3	Western-blot Analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ-GCL, SOD-1 και CAT .....	42
5.	Συζήτηση.....	43
6.	Βιβλιογραφία .....	49

## Περίληψη

Ο καφές αποτελεί ένα από τα πιο διάσημα και ευρέως καταναλώσιμα ροφήματα παγκοσμίως, γεγονός που οφείλεται στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (γεύση και άρωμα). Το ρόφημα αυτό δημιουργείται έπειτα από επεξεργασία των κόκκων του φυτού *Coffea sp* και λόγω της φυτικής του προέλευσης χαρακτηρίζεται από πληθώρα βιοδραστικών ουσιών όπως είναι το αλκαλοειδές καφεΐνη και οι πολυφαινόλες. Η μεγάλη κατανάλωση του καφέ σε παγκόσμια κλίμακα έχει προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες για τη διερεύνηση της επίδρασης του ροφήματος αυτού στην ανθρώπινη υγεία. Έχουν προκύψει ποικίλα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες, όμως ο μηχανισμός δράσης του καφέ παραμένει ακόμη άγνωστος. Η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολείται με την επίδραση της κατανάλωσης καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος και συγκεκριμένων ιστών επίμυων καθώς και την περαιτέρω διερεύνηση των αιτιών αυτής της επίδρασης σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών. Χρησιμοποιήθηκε ρόφημα καφέ που σε *in vitro* πειράματα παρουσίασε την πιο ισχυρή δράση και η δοσολογία επιλέχθηκε ώστε να αντικατροπτίζει την ημερήσια κατανάλωση καφέ που πραγματοποιεί ένας ενήλικας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο καφές βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση τόσο του αίματος όσο και των ιστών του γαστρεντερικού συστήματος και του ήπατος, ενώ σε μοριακό επίπεδο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφής (mRNA) και της μετάφρασης (πρωτεΐνη) του ενζύμου λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (γ-GCL), το οποίο καταλύει το πρώτο βήμα σχηματισμού της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο ενδοκυτταρικό μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μόριο του οργανισμού.

## Abstract

Coffee is one of the most famous and widely consumed beverages worldwide due to its unique flavor and aroma. This beverage is made from roasted green coffee beans, which are the seeds of berries derived from the *Coffea sp* plant. Since coffee is a plant derivative it contains various bioactive compounds such as caffeine and polyphenols. The huge consumption of coffee all around the world has attracted the scientific interest of many researchers and as a result there have been conducted several studies that investigate its human health benefits. Contradicting results have been reported by these studies, but there is a lack of information regarding coffee's molecular mechanism of action. Therefore, this study investigates the impact of coffee consumption in rat redox status both in their blood and in some of their tissues, as well as the molecular mechanisms behind this effect (mRNA levels, protein levels). The results led to the conclusion that coffee did improve the redox status in rats' blood and tissues. At a molecular level there was reported a significant increase in transcription and translation of the  $\gamma$ -Glutamate Cysteine Ligase ( $\gamma$ -GCL) enzyme which catalyzes the first and rate-limiting step in the biosynthesis of glutathione, which is the main cellular antioxidant.



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ο καφές

Ο καφές χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο διάσημα ροφήματα και καταναλώνεται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα. Τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, και κυρίως η πλούσια γεύση του, το καθιστούν ιδιαίτερα απολαυστικό και του προσδίδουν διεγερτικές ιδιότητες και αναζωογονητική δράση (Priftis et al., 2015). Για την πλειοψηφία των ανθρώπων αποτελεί καθημερινή συνήθεια. Το ρόφημα αυτό παράγεται από καβουρδισμένους κόκκους του φυτού *Coffea sp* και μπορεί να σερβιριστεί τόσο ζεστό όσο και κρύο, με ζάχαρη ή σαντιγί και πολυάριθμους άλλους τρόπους. Οι δύο ποικιλίες που καταναλώνονται παγκοσμίως είναι η *Coffea arabica* και η *Coffea canephora* (Robusta). Η ποικιλία Robusta χαρακτηρίζεται από σχεδόν διπλάσια ποσότητα καφεΐνης. Λόγω της τόσο μεγάλης κατανάλωσης του καφέ, τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην διερεύνηση της επίδρασης των συστατικών του στην ανθρώπινη υγεία.

Το καβούρδισμα των κόκκων του καφέ είναι απαραίτητο για την δημιουργία του καταναλώσιμου ροφήματος. Ο καφές, όμως, συλλέγεται από το φυτό με τη μορφή πράσινων κόκκων, οι οποίοι εμφανίζουν διαφορές στη σύστασή τους σε σχέση με τους ψημένους κόκκους που προκύπτουν μετά τη θέρμανση (Priftis et al., 2015). Οι διαφορές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1:** Ποσοστιαία σύσταση των πράσινων και των καβουρδισμένων κόκκων του καφέ.

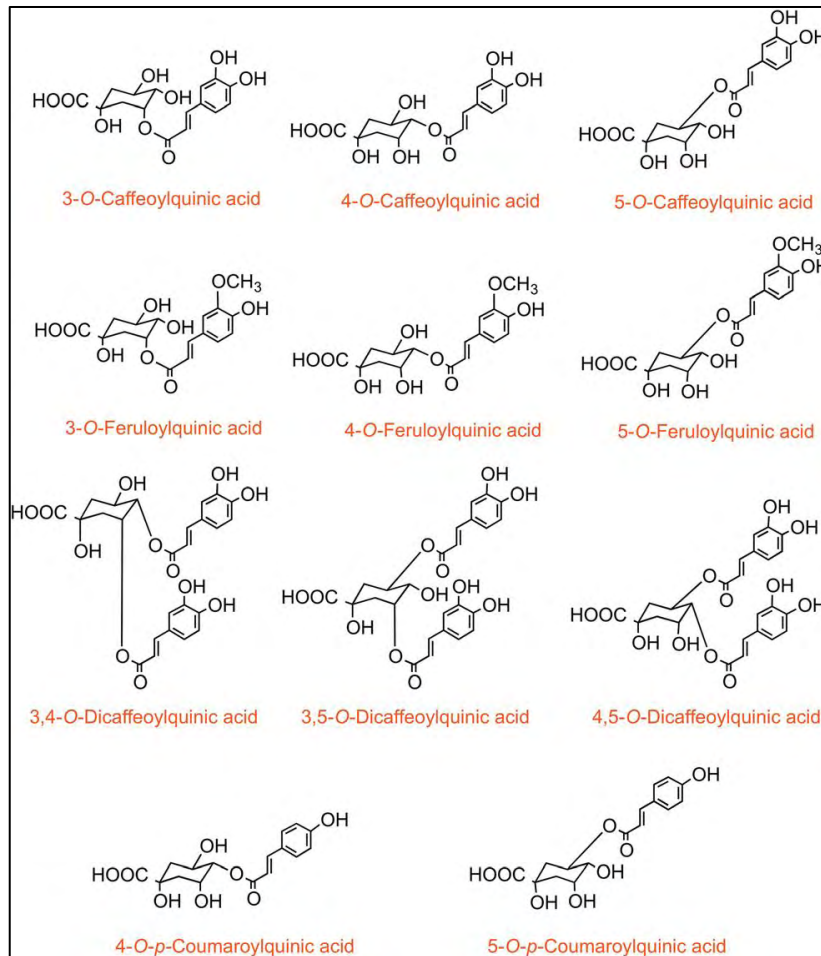
Πράσινοι κόκκοι	Ψημένοι κόκκοι
Υδατάνθρακες (59-61%)	Υδατάνδρακες (38-42 %)
Λιπίδια (10-16%)	Λιπίδια (11-17%)
Πρωτεΐνες (10%)	Πρωτεΐνες (8%)
Χλωρογενικά οξέα (7-10%)	Χλωρογενικά οξέα (3-4%)
Μέταλλα (4%)	Μέταλλα (5%)
Αλειφατικά οξέα (2%)	Αλειφατικά οξέα (3%)
Καφεΐνη (1-2%)	Καφεΐνη (1-2%)
Ελεύθερα αμινοξέα	Ελεύθερα αμινοξέα
-	Προϊόντα αντιδράσεων Maillard

Η διαφορά στη σύσταση έγκειται κυρίως στη μείωση των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των χλωρογενικών οξέων τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στο σχηματισμό των μελανοϊδινών που αποτελούν τα προϊόντα τελικού σταδίου των αντιδράσεων Maillard. Άλλα συστατικά όπως τα μέταλλα, τα αλειφατικά οξέα, η καφεΐνη και ελεύθερα αμινοξέα έχει δειχθεί ότι διατηρούν το ποσοστό τους και μετά το καβούρδισμα των κόκκων (Moreira, Nunes, Domingues, & Coimbra, 2012).

## 1.2 Πολυφαινόλες

Ο καφές διαθέτει πληθώρα βιοδραστικών ουσιών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές του δράσεις με πιο χαρακτηριστική την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ικανότητα αυτή, όπως και άλλες θετικές επιδράσεις του καφέ, αποδίδεται κατά κύριο λόγο στο βασικό συστατικό του, την καφεΐνη. Έχει δειχθεί, όμως, ότι και άλλες ενώσεις όπως οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από σημαντική για τον οργανισμό αντιοξειδωτική δράση (Pandey & Rizvi, 2009). Οι πολυφαινόλες είναι δευτεροταγείς φυτικοί μεταβολίτες που συμμετέχουν στην άμυνα του φυτικού οργανισμού εναντίον παθογόνων. Η κατανάλωση των ενώσεων αυτών έχει συσχετιστεί με πολλαπλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία καθώς η αντιοξειδωτική τους δράση φαίνεται να προσφέρει προστασία από ασθένειες με χαρακτηριστικά παραδείγματα τον καρκίνο, το σακχαρώδη διαβήτη και καρδιαγγειακές νόσους (Pandey & Rizvi, 2009).

Οι βασικότεροι εκπρόσωποι των πολυφαινολών που βρίσκονται στον καφέ είναι τα χλωρογενικά οξέα με κύρια τα 3 ισομερή του καφεϋλοκινικού οξέος (3-, 4-, 5-CQA) (Εικόνα 1). Το ποσοστό των πολυφαινολών σε ένα συγκεκριμένο ρόφημα καφέ επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο χρόνος ψησίματος των κόκκων του καθώς και ο τρόπος επεξεργασίας τους για την παραγωγή υγρού ροφήματος. Επιπλέον, η δραστηριότητα των χλωρογενικών οξέων ενός ροφήματος καφέ εξαρτάται και από την απορρόφησή τους από τον οργανισμό. Κατά μήκος της εντερικής οδού, τα συστατικά του καφέ περνούν από πολλά μεταβολικά στάδια και, τελικά, μόνο συγκεκριμένες ενώσεις απορροφώνται από το λεπτό έντερο, ενώ κάποιες άλλες από το κόλον (Del Rio, Stalmach, Calani, & Crozier, 2010). Έκτος από την αντιοξειδωτική δράση, τα χλωρογενικά οξέα έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν και αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση και φαίνεται, επίσης, ότι είναι σημαντικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπών στον οργανισμό (Liang & Kitts, 2015; Meng, Cao, Feng, Peng, & Hu, 2013).



**Εικόνα 1:** Δομές των χλωρογενικών οξέων του καφέ (Ludwig, Clifford, Lean, Ashihara, & Crozier, 2014)

### 1.3 Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται άτομα, μόρια ή ιόντα που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τουλάχιστον ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου στην εξωτερική τους στιβάδα και διαθέτουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με γειτονικά μόρια μέσα στα κύτταρα (Halliwell & Gutteridge, 1990).

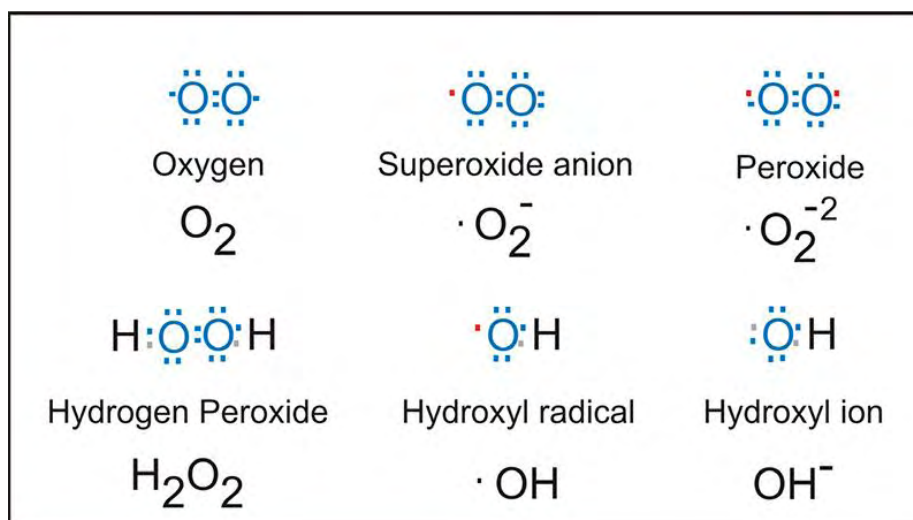
Η ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων στην εξωτερική στιβάδα καθιστά της ελεύθερες ρίζες ιδιαίτερα ασταθείς και δραστικές εφόσον εμφανίζουν μεγάλη έλξη προς ηλεκτρόνια γειτονικών μορίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις) και μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιδράσεις στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με πυρηνόφιλα μόρια όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με συνέπεια το σχηματισμό νέων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να αντιδράσουν και να δημιουργήσουν νέες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο να προκύψει μια αλυσιδωτή αντίδραση με επιβλαβή αντίκτυπο στον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge, 1990). Οι

κυριότερες ελεύθερες ρίζες είναι αυτές που διαθέτουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο καθώς και αυτές που διαθέτουν ως κεντρικό άτομο το άζωτο.

## 1.4 Δραστικές μορφές

### 1.4.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικά μόρια που διαθέτουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο. Οι ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) όμως δεν είναι όλες οι δραστικές μορφές οξυγόνου ελεύθερες ρίζες με χαρακτηριστικό παράδειγμα το άκρως δραστικό υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

### 1.4.2 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου έτσι και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS: Reactive Nitrogen Species) περιλαμβάνουν τόσο ελεύθερες ρίζες όσο και μη- ρίζες και είναι εξαιρετικά δραστικές. Βασικότερες δραστικές μορφές αζώτου αποτελούν το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και ο περοξυνιτρίτης (ONOO). Οι δραστικές μορφές αζώτου απεικονίζονται στην Εικόνα 3.

Reactive Nitrogen Species (RNS)	
<b>Radicals:</b>	
$\text{NO}\cdot$	Nitric Oxide
$\text{NO}_2\cdot$	Nitrogen dioxide
<b>Non-Radicals:</b>	
$\text{ONOO}^-$	Peroxynitrite
$\text{ROONO}$	Alkyl peroxyntrites
$\text{N}_2\text{O}_3$	Dinitrogen trioxide
$\text{N}_2\text{O}_4$	Dinitrogen tetroxide
$\text{HNO}_2$	Nitrous acid
$\text{NO}_2^+$	Nitronium anion
$\text{NO}^-$	Nitroxyl anion
$\text{NO}^+$	Nitrosyl cation
$\text{NO}_2\text{Cl}$	Nitryl chloride

Εικόνα 3: Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

## 1.5 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες παράγονται τόσο από ενδογενείς πηγές ως παραπροϊόντα φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού όσο και από εξωγενείς πηγές.

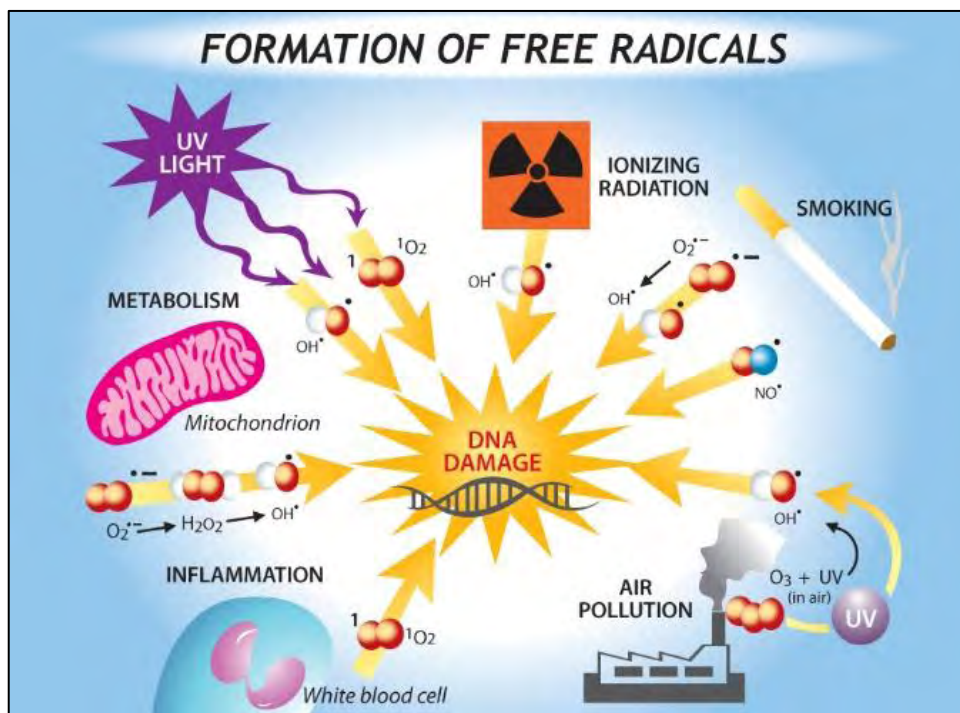
Οι βασικότερες ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι οι εξής (M. Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006):

1. Η κύρια ενδογενής πηγή ελευθέρων ριζών είναι τα μιτοχόνδρια στα οποία πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση (αναπνευστική αλυσίδα). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τρία πρωτεϊνικά συμπλέγματα ενσωματωμένα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (σύμπλεγμα αφυδρογονάσης NADH, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και δύο ελεύθερα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c). Τα μόρια της αλυσίδας εφοδιάζονται τα ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH<sub>2</sub>, ενώ τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την πλήρη αναγωγή του σε νερό. Παρόλα αυτά, η διαδικασία αυτή δεν αφορά το 100% του μοριακού οξυγόνου και ένα ποσοστό 1-5 % διαφεύγει με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου.
2. Το οξυγόνο που δεν συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια υφίσταται ενζυμικές τροποποιήσεις από πληθώρα ενζύμων στη

κυτταροπλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτές τις τροποποιήσεις αποτελούν η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η 5- λιποξυγενάση και η οξειδάση της ξανθίνης. Η δράση τους έχει ως συνέπεια τη δημιουργία δραστικών μορφών όπως το  $O_2^{\cdot-}$ , το  $H_2O_2$  και το  $HO^{\cdot}$  τα οποία είναι ενδιάμεσα προϊόντα της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από τα παραπάνω ένζυμα.

3. Το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του οργανισμού παράγει ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αντιμετωπίσει διάφορες βλάβες που προκαλεί η είσοδος παθογόνων. Δραστικές μορφές παράγονται και από τη φλεγμονή λόγω δράσης της οξειδάσης του NADPH.

Στις εξωγενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου ανήκουν η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα, το κάπνισμα, περιβαλλοντική μόλυνση του αέρα καθώς και η διατροφή.



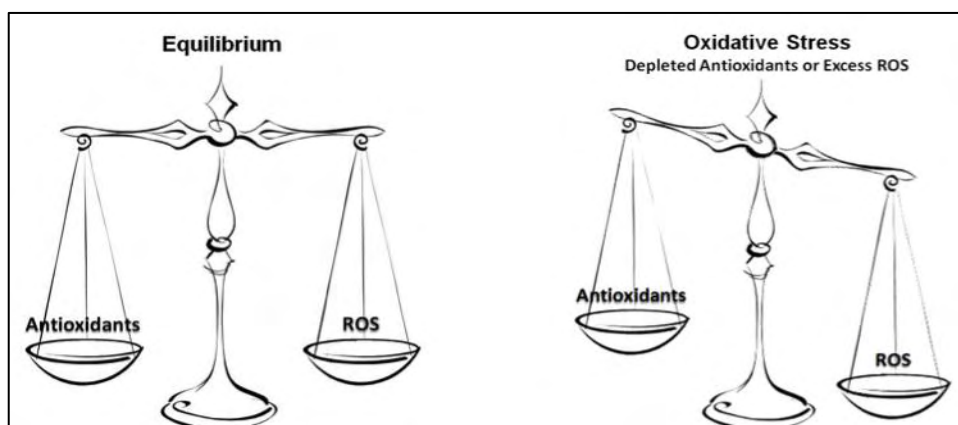
Εικόνα 4: Βασικές ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

## 1.6 Κατάσταση οξειδωτικού στρες

Κάθε βιολογικό σύστημα χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας κατάστασης ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Αν η οξειδοαναγωγική αυτή ισορροπία διαταραχθεί σε βάρος

της αδρανοποίησης των δραστικών μορφών τότε δημιουργείται στο κύτταρο κατάσταση οξειδωτικού στρες καθώς οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου δεν είναι ικανοί να περιορίσουν τις ελεύθερες ρίζες και, γενικά, τις δραστικές μορφές (Pisoschi & Pop, 2015). Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας επιφέρει σημαντικές λειτουργικές αλλαγές στα βασικά συστατικά του κυττάρου και είναι πιθανό το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει είτε ως αποτέλεσμα αυξημένων επιπέδων προοξειδωτικών μορίων (ROS, RNS) είτε ως συνέπεια ανεπαρκούς λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Στην πρώτη περίπτωση, η αύξηση των προοξειδωτικών μορίων μπορεί να οφείλεται σε έκθεση του οργανισμού σε κάποιων τοξικό παράγοντα που αυξάνει την παραγωγή δραστικών μορφών μέσα στα κύτταρα, ενώ στη δεύτερη περίπτωση διάφορες μεταλλάξεις ή γενοτοξικοί παράγοντες προκαλούν βλάβες στα αντιοξειδωτικά συστήματα του κυττάρου. Τέλος, και η ανεπαρκής λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών μέσω της τροφής μπορεί να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της κατάστασης οξειδωτικού στρες

## 1.7 Διαταραχές λόγω οξειδωτικού στρες

Η κατάσταση του οξειδωτικού στρες συνεπάγεται αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου στο κύτταρο. Αυτά τα άκρως δραστικά μόρια αντιδρούν με σημαντικά βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια και, έτσι, μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς αλλοιώσεις για το κύτταρο. Ακόμη, επιδρούν στις κυτταρικές μεμβράνες παρεμποδίζοντας την διακυτταρική επικοινωνία καθώς και στα μιτοχόνδρια προκαλώντας βλάβες στην αλυσίδα παραγωγής ενέργειας. Αυτή η συνολική απορρύθμιση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας είναι πιθανό να

οδηγήσει το κύτταρο σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και σχετίζεται με πληθώρα ασθενειών (Pisoschi & Pop, 2015).

Έχει αποδειχθεί άμεση συσχέτιση της αύξησης του οξειδωτικού στρες με την αύξηση της ηλικίας. Γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως παράγοντας γήρανσης. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες έχει καθοριστικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer και το Parkinson καθώς και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Ακόμη, φαίνεται να σχετίζεται και με τον καρκίνο, το σακχαρώδη διαβήτη, καρδιαγγειακές νόσους καθώς και με αναπνευστικά προβλήματα και δερματικές παθήσεις (Marian Valko et al., 2007).



Εικόνα 6: Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες

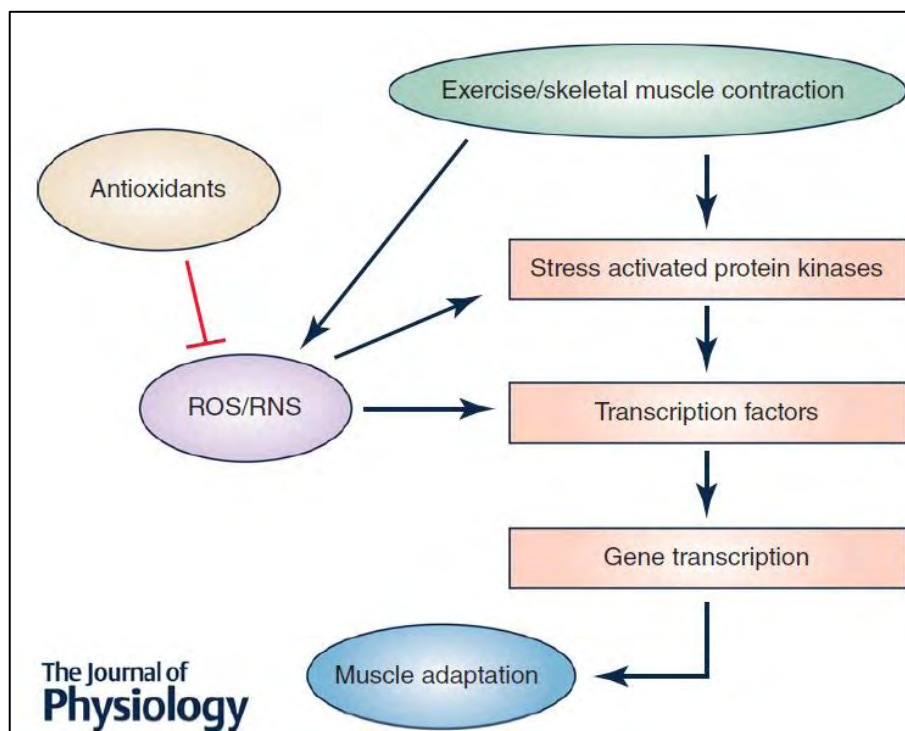
## 1.8 Ευεργετικές επιδράσεις λόγω οξειδωτικού στρες

Παλαιότερα, επικρατούσε η απόλυτη άποψη ότι το οξειδωτικό στρες είναι μια επιβλαβής κατάσταση για την υγεία του οργανισμού και τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών πρέπει να περιορίζονται με χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών. Τα τελευταία χρόνια, όμως, πολλαπλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η άποψη αυτή δεν είναι ορθή καθώς οι δραστικές μορφές παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό και χαρακτηρίζονται από πολλαπλές δράσεις.

Οι σημαντικότερες φυσιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα σχετίζονται με τη λειτουργία τους ως αγγελιοφόρα μηνύματα στην κυτταρική σηματοδότηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δράση τους κατά την άσκηση. Συγκεκριμένα, μετά την άσκηση οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου φαίνεται να επάγουν πρωτεϊνικές κινάσες-αισθητήρες του οξειδωτικού στρες οι οποίες οδηγούν



σε μετακίνηση μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα και, τελικά, έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με μυϊκές προσαρμογές του οργανισμού λόγω της άσκησης (Εικόνα 7). Έτσι, χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να παρεμποδίσει το μονοπάτι και κατ' επέκταση τις προσαρμογές και τα οφέλη της άσκησης (Merry & Ristow, 2016).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου μετά από άσκηση (Merry & Ristow, 2016)

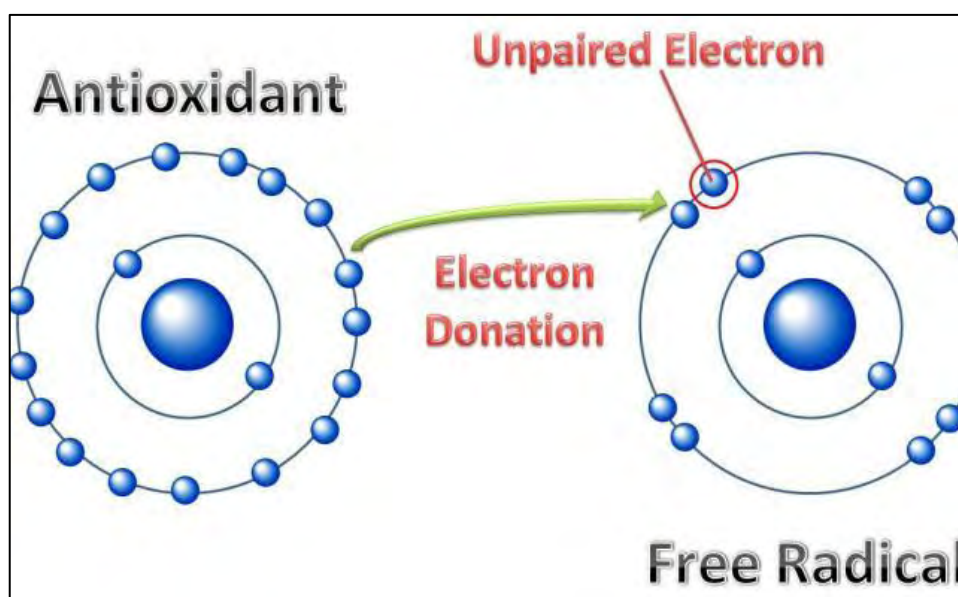
Άλλες ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών είναι η συμμετοχή τους στην άμυνα του οργανισμού, δηλαδή σε διαδικασίες απομάκρυνσης παθογόνων μέσω φαγοκυττάρωσης και φλεγμονής, στην διαδικασία της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου καθώς, επίσης, και στην κυτταρική ωρίμανση και διαφοροποίηση. Επομένως, η κατανάλωση αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία και να μην επιδιώκεται η διατάραξη της σε βάρος των ελευθέρων ριζών που θα οδηγούσε σε πλήρη εξουδετέρωσή τους (Schieber & Chandel, 2014).

## 1.9 Αντιοξειδωτική άμυνα

### 1.9.1 Γενικά

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζεται μία ουσία που βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με το υπόστρωμά της και παρεμποδίζει μερικώς ή πλήρως την οξείδωση αυτού (Kriinsky, 2002). Μία αντιοξειδωτική ουσία μπορεί να έχει τόσο άμεση όσο και έμμεση δράση. Συγκεκριμένα, μπορεί να δράσει απευθείας (άμεσα)

προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα να την καταστήσει αδρανή (δράση ως scavenger) (Εικόνα 8). Ακόμη, μπορεί να δράσει και έμμεσα δηλαδή να επάγει τη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων όπως ο Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται με βάση την προέλευση τους σε ενδογενή και εξωγενή, με βάση τη διαλυτότητα τους σε υδρόφιλα και λιπόφιλα και, τέλος, με βάση τη χημική τους φύση σε ενζυμικά και μη ενζυμικά (Carocho & Ferreira, 2013).



Εικόνα 8: Άμεση δράση αντιοξειδωτικών ουσιών

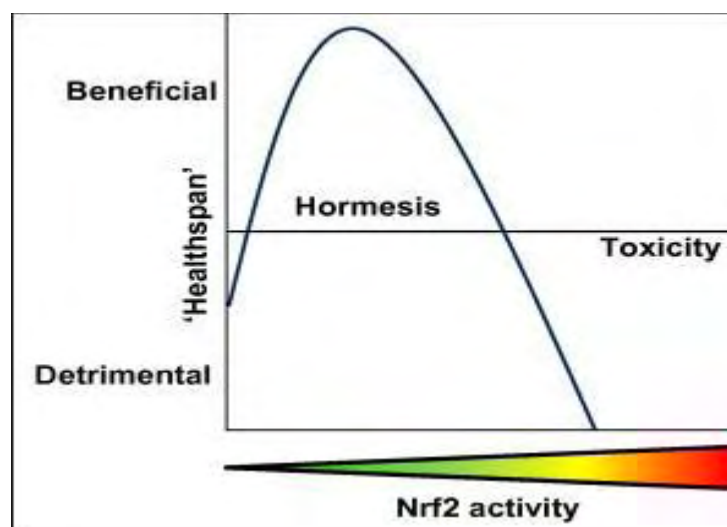
### 1.9.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια τα προσλαμβάνει ο οργανισμός μέσω της διατροφής καθώς δεν μπορεί να τα συνθέσει ο ίδιος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και διάφορα ιχνοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, ψευδάργυρος, μαγνήσιο).

Συγκεκριμένα, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E αποτελούν τα πιο ευρέως καταναλώσιμα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα. Η βιταμίνη C αποτελεί υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται σε πράσινα λαχανικά και εσπεριδοειδή και έχει την ικανότητα να αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζει το σχηματισμό καρκινογόνων ενώσεων, ενώ παράλληλα βοηθά στην αναγέννηση της βιταμίνης E. Η α-τοκοφερόλη είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό μόριο που προσλαμβάνεται από τροφές όπως τα ψάρια και έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την υπεροξείδωση των

μεμβρανών και να ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (Marian Valko, Izakovic, Mazur, Rhodes, & Telser, 2004).

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες που χορηγούνται εξωγενώς δύναται να εμφανίσουν είτε αντιοξειδωτικό είτε προοξειδωτικό ρόλο μέσα στα κύτταρα του οργανισμού. Υπάρχουν τρεις παράγοντες που καθορίζουν ποιόν από τους δύο ρόλους θα έχουν τα αντιοξειδωτικά: η όρμηση, το χρονικό σημείο χορήγησης και η βιοδιαθεσιμότητά τους μέσα στον οργανισμό. Αρχικά, το φαινόμενο της όρμησης αφορά τη δόση των αντιοξειδωτικών που χορηγείται καθώς μια υψηλή δόση πιθανότατα να εμφανίσει προοξειδωτικό χαρακτήρα αφού τα ίδια τα αντιοξειδωτικά θα μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες (Calabrese, 2004) (Εικόνα 9). Το χρονικό σημείο χορήγησης του αντιοξειδωτικού διαδραματίζει εξίσου καθοριστικό ρόλο καθώς αν η χορήγηση γίνει πριν οι ελεύθερες ρίζες φτάσουν στη συγκέντρωση που είναι απαραίτητη για φυσιολογική κυτταρική λειτουργία τότε το αντιοξειδωτικό καθίσταται επιβλαβές (Radak et al., 2017). Τέλος, η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στον μεταβολισμό του αντιοξειδωτικού μέσα σε έναν ζωντανό οργανισμό, οποίος επηρεάζει και τη δράση του αντιοξειδωτικού μέσα στα κύτταρα.



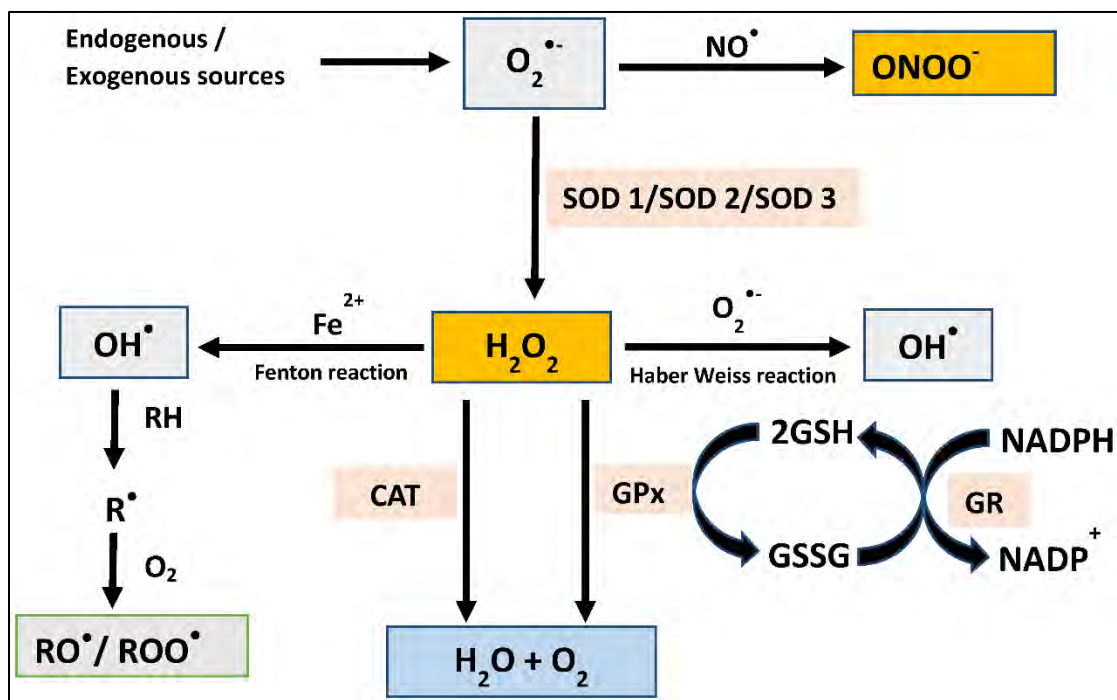
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της όρμησης.

### 1.9.3 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να τα παράγει ο οργανισμός από μόνος του και διακρίνονται στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά και στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Στα μη ενζυμικά κύριοι εκπρόσωποι αποτελούν το ουρικό οξύ και η γλουταθειόνη. Το ουρικό οξύ είναι το κύριο αντιοξειδωτικό του πλάσματος, ενώ ακολουθούν η αλβουμίνη και η χολερυθρίνη. Αντίστοιχα, μέσα στα κύτταρα βασικό αντιοξειδωτικό είναι η γλουταθειόνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την αδρανοποίηση ελευθέρων ριζών,

την διατήρηση των βιταμινών C και E στην ανηγμένη τους μορφή καθώς και τον μεταβολισμό και την απομάκρυνση ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό (αντιδράσεις φάσης II).

Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού ανήκουν ένζυμα όπως η υπεροξειδάση (GPx) και η αναγωγάση (GR) της γλουταθειόνης. Το πρώτο ένζυμο διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH σε GSSG), ενώ το δεύτερο εξασφαλίζει την ανακύκλωση της γλουταθειόνης και κατ' επέκταση τη δραστηριότητά της. Επιπρόσθετα, πολύ σημαντικά ένζυμα της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού αποτελούν η καταλάση (CAT), η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) καθώς και η λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης.



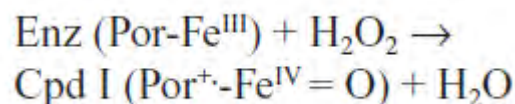
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού του κυττάρου

## 1.10 Κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα

### 1.10.1 Καταλάση (Catalase/CAT)

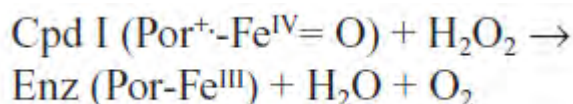
Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες κάθε μια από τις οποίες διαθέτει μια προσθετική ομάδα αίμης. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και το κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων και καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νερού (Putnam, Argvai, Bourne, & Tainer, 2000). Είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό ένζυμο που βοηθά στον περιορισμό του οξειδωτικού στρες και την προστασία των κυτταρικών συστατικών από τις ελεύθερες ρίζες.

Ο μηχανισμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου πραγματοποιείται μέσω 2 αντιδράσεων. Στην πρώτη αντίδραση, ο σίδηρος  $\text{Fe}^{3+}$  της προσθετικής ομάδας της αίμης ανάγει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό με ταυτόχρονη παραγωγή  $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$  (ένωση I).



(Chelikani, Fita, & Loewen, 2004b)

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, η ένωση I οξειδώνει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο, ενώ η ίδια μετατρέπεται σε νερό.



(Chelikani et al., 2004b)

Συνεπώς, προκύπτουν συνολικά 2 μόρια νερού και ένα μόριο μοριακού οξυγόνου (Putnam et al., 2000).

### 1.10.2 Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου εντοπίζεται με διαφορετική ισομορφή σε διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Είναι το ένζυμο που καταλύει τη αναγωγή του ανιόντος σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ) σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η SOD των μιτοχονδρίων χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα το Μαγγάνιο (Mn), ενώ η SOD του κυτταροπλάσματος χρησιμοποιεί Χαλκό (Cu) και Ψευδάργυρο (Zn). Η ισομορφή SOD1 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε διμερή μορφή. Κάθε υπομονάδα του ενζύμου περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο, καθώς και ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των υπομονάδων της (Sea et al., 2015).

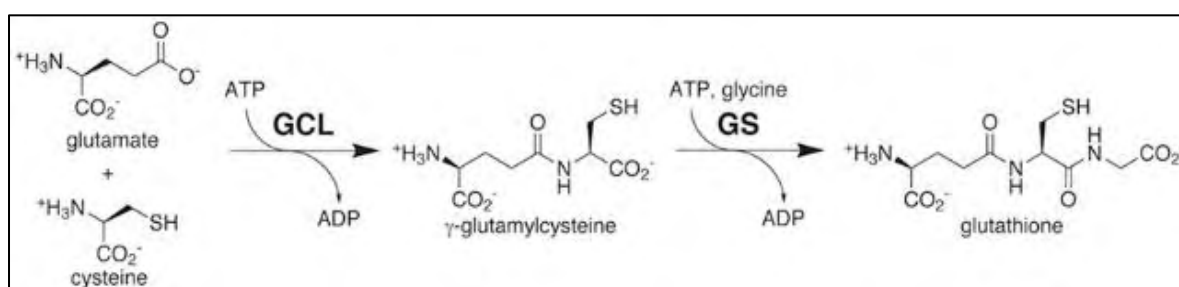
Το ανιόν σουπεροξειδίου αποτελεί μία από τις πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, γι' αυτό το λόγο η δράση της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου είναι εξαιρετικά σημαντική για την αποφυγή δυσμενών επιδράσεων του στα κύτταρα.

### 1.10.3 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (γ-GCL)

Η λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (γ- GCL) αποτελεί έμμεσα αντιοξειδωτικό ένζυμο καθώς δεν εξουδετερώνει κάποια δραστική μορφή οξυγόνου ή αζώτου, όμως είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό της γλουταθειόνης. Όλοι οι οργανισμοί, από τον πιο απλό έως τον πιο πολύπλοκο, εκφράζουν κάποια ισομορφή του συγκεκριμένου ενζύμου, ενώ έλλειψη έκφρασης ή μη ορθή λειτουργία του ενζύμου έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο καρκίνος και ο σακχαρώδης διαβήτης (Lu, 2009).

Δομικά, η γ- GCL αποτελείται από δύο διαφορετικές μεταξύ τους πρωτεϊνικές υπομονάδες (ετεροδιμερές ένζυμο). Η μία υπομονάδα διαθέτει καταλυτικό ρόλο και αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα, ενώ η άλλη διαθέτει ρυθμιστικό ρόλο (Franklin et al., 2009).

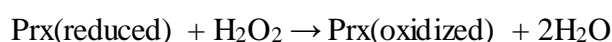
Η αντίδραση που καταλύει η λιγάση της γ- γλουτάμυλο κυστεΐνης απεικονίζεται στην Εικόνα 11 και αποτελεί το πρώτο βήμα του σχηματισμού της γλουταθειόνης, το οποίο καθορίζει και την ταχύτητα της αντίδρασης παραγωγής αυτού του τόσο σημαντικού ενδοκυτταρικού αντιοξειδωτικού μορίου.



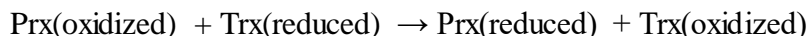
**Εικόνα 11:** Αντίδραση σχηματισμού της γλουταθειόνης. Το πρώτο βήμα καταλύεται από την γ- GCL

### 1.10.4 Περοξειρεδοξίνες

Οι περοξειρεδοξίνες αποτελούν μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα οφείλεται στην ύπαρξη ενός καταλοίπου κυστεΐνης που δεν βρίσκεται συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό. Αυτή η ανηγμένη κυστεΐνη διαθέτει ελεύθερη σουλφυδρυλική ομάδα η οποία προσφέρει ηλεκτρόνιο και ανάγει το υπόστρωμα (υπεροξειδίο). Τα ένζυμα αυτής της οικογένειας ρυθμίζονται μέσω πολλών μηχανισμών όπως η φωσφορυλίωση, η οξειδοαναγωγική κατάσταση και η ακετυλίωση. Συγκεκριμένα η αντίδραση που πραγματοποιούν είναι η εξής:



Μετά την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι περοξειρεδοξίνες χρησιμοποιούν τη θειορεδοξίνη για να αναγεννηθούν:



(Sue, Ho, & Kim, 2005)

## 2. Σκοπός

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης ενός συγκεκριμένου εκχύλισματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση στο αίμα και σε τέσσερις ιστούς (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ) επίμυων. Αυτό το *in vivo* πείραμα παρέχει στοιχεία για την επίδραση του καφέ σε ζωντανούς οργανισμούς και θα μπορούσε δυνητικά να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία ενός βελτιωμένου ροφήματος καφέ με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση για τον άνθρωπο.

## 3. Υλικά και μέθοδοι

### 3.1 Χορήγηση καφέ σε αρουραίους και συλλογή ιστών

#### 3.1.1 Χορήγηση καφέ

Για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 12 αρουραίοι Wistar ηλικίας 3 μηνών, αρσενικού φύλου στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα καφέ για 14 ημέρες. Η δοσολογία ήταν 7,5 ml ανά kg σωματικού βάρους μία φορά την ημέρα μέσω του νερού. Το εκχύλισμα καφέ που επιλέχθηκε για τη χορήγηση εμφάνισε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε *in vitro* μελέτες.

#### 3.1.2 Συλλογή αίματος και ιστών

Μετά το πέρας των 14 ημερών, οι αρουραίοι θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από την καρδιά καθώς και συλλογή των ιστών. Το αίμα αποθηκεύτηκε σε ειδικά σωληνάκια με αντιπηκτικό (EDTA), ενώ οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο. Ολόκληρη η διαδικασία χορήγησης του καφέ στα πειραματόζωα και η λήψη των ιστών και του αίματος για ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φυσιολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Ταϊτζόγλου.

## 3.2 Επεξεργασία αίματος και ομογενοποίηση ιστών

### 3.2.1 Επεξεργασία αίματος

Μετά από τις αιμοληψίες, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δειγμάτων αίματος των αρουραίων, σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο, με σκοπό τη συλλογή αιμολύματος και πλάσματος, τα οποία φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους. Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα προσδιορίστηκε η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η αιμοσφαιρίνη και η καταλάση, ενώ στο πλάσμα προσδιορίστηκαν τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

#### Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση των σωληναρίων συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκέντρωση στα 1370g, για 10 λεπτά, στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
2. Συλλογή του υπερκειμένου (πλάσμα) και το διαχωρισμός του σε φιαλίδια eppendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
3. Προσθήκη απιονισμένου νερού (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρωση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
4. Βίαιη ανακίνηση και φυγοκέντρωση στα 4020g, για 15 λεπτά, στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. Συλλογή υπερκειμένου, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20μL).
6. Διαχωρισμός του αιμολύματος σε eppendorf ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Στη συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης:

1. Προσθήκη 500μl αιμολύματος σε 500μl 5% TCA σε eppendorf και ανακίνηση στο vortex.
2. Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 5 min στους  $5^{\circ}\text{C}$ .
3. Συλλογή του υπερκειμένου σε eppendorf και προσθήκη 5% TCA με αναλογία 300μL αιμολύματος / 90μL 5% TCA και ανάδευση με vortex.
4. Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 5 min στους  $5^{\circ}\text{C}$ .



5. Μεταφορά του καθαρού υπερκείμενου σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της γλουταθειόνης.

### *3.2.2 Ομογενοποίηση ιστών*

Για την ομογενοποίηση των ιστών (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ) ζυγίστηκαν 100-150 mg από τον κάθε ιστό των 12 αρουραίων σε falcon. Έπειτα, προστέθηκε σε καθένα falcon δεκαπλάσια σε σχέση με το βάρος του ποσότητα PBS, Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με χρήση ειδικού ομογενοποιητή, ενώ στη συνέχεια έγινε χρήση μηχανήματος υπερήχων. Τέλος, το ομογενοποίημα από κάθε ιστό μεταφέρθηκε σε erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στα 5.000g για 5 min στους 5 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέα erpendorfs τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80 °C και χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες.

## **3.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης**

### *3.3.1 Γενικά*

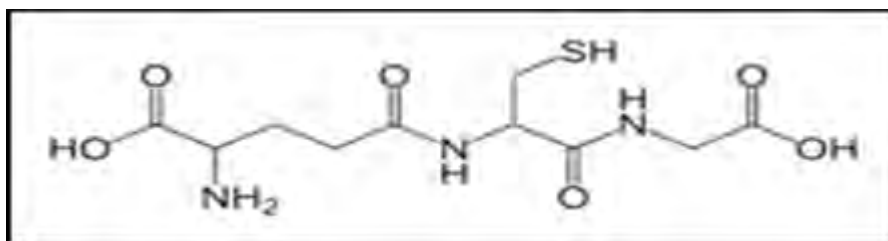
Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η ικανότητα διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ παράλληλα γίνεται εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος και των ιστών. Αντίστοιχα, για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας δείκτης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την οξείδωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

### *3.3.2 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford*

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

### 3.3.3 Μέτρηση Γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15mM. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές της ιδιότητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια καθώς και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

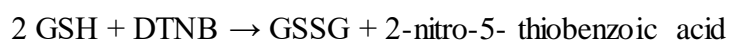


Εικόνα 12: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

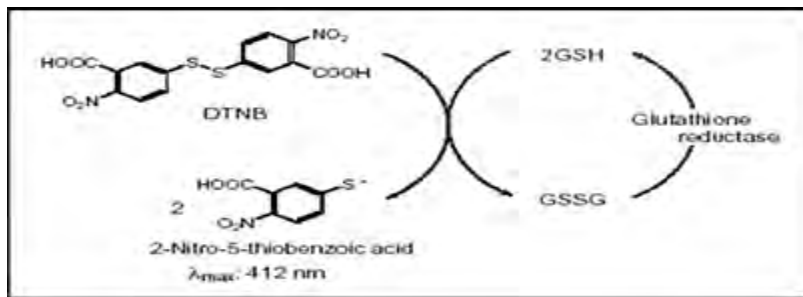
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Ακόμη, έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον, η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών είναι εξαιρετικά σημαντική (Sengupta, Ghosh, & Bhattacharjee, 2004).

#### Μέθοδος:

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρείται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm .



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 13: Ανακόκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

### Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer** 67mM (pH 7,95).
- **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό.
- **Κιτρικό Νάτριο**. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

### Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχικά, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα και DTNB σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH.

	Blank	Sample
<b>Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95</b>	<b>660 μL</b>	<b>660 μL</b>
<b>DTNB 1 mM</b>	<b>330 μL</b>	<b>330 μL</b>
<b>PBS</b>	<b>20 μL</b>	<b>-</b>
<b>Ομογενοποιημένος Ιστός ή Αίμα</b>	<b>-</b>	<b>20 μL</b>

Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000g για 5 min στους 5°C και μεταφορά του περιεχομένου τους σε μια πλαστική κυψελίδα για μέτρηση της απορρόφηση στα 412 nm .

### 3.3.4 Ικανότητα διάσπασης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Μέθοδος:

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα ο οργανισμός διαθέτει ειδικά ένζυμα, όπως η καταλάση και οι περοξυρεδοξίνες, τα οποία καταλύουν γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelika ni,

Fita, & Loewen, 2004a). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα.

### Διαλύματα

**Phosphatebuffer 67mM (pH 7.4)**

**30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

### Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

**Πίνακας 3:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ιστό.

	Δείγμα
<b>Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4</b>	<b>3000 - ιστό μL</b>
<b>Ομογενοποιημένος Ιστός</b>	<b>4-40 μL</b>

**Πίνακας 4:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

	Δείγμα
<b>Phosphatebuffer 67 mM, pH 7.4</b>	<b>2991 μL</b>
<b>αιμόλυμα αραιωμένο 1/10</b>	<b>4 μL</b>

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37°C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην κυψελίδα, την ανακινούμε χρησιμοποιώντας παραφίλμ και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 120 δευτερόλεπτα.

### 3.3.5 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην

ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

### **Μέθοδος:**

Η TAC των ιστών στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνου που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH<sup>\*</sup>) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska και Bartosz (Janaszewska & Bartosz, 2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

### **Διαλύματα**

- **Phosphate buffer 10mM (pH 7.4).**
- **DPPH 0.1mM. MB: 394.32**
- **Ασκορβικό οξύ 10mM.**

### **Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα**

Προσθήκη των παρακάτω ποσοτήτων στα Eppendorfs:

**Πίνακας 5:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC σε ιστό/ πλάσμα.

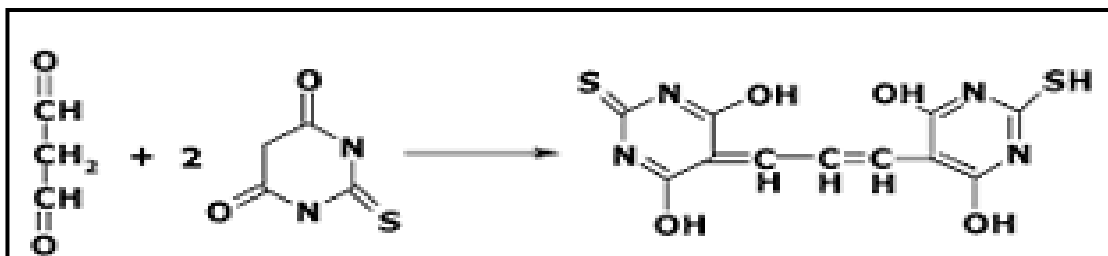
	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	480 $\mu$ L	480 $\mu$ L
DPPH 0.1 mM	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Ιστός ή πλάσμα	-	20 $\mu$ L
PBS	20 $\mu$ l	-

Πραγματοποιείται ανακίνηση των eppendorfs μερικές φορές και τα επώαση στο σκοτάδι για 45 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση: υδραζίνη. Γίνεται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 15000g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρονται 900mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση στα 520 nm.

### 3.3.6 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

#### Μέθοδος:

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος που στοχεύει στον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 14: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος (Keles, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 2001).

### **Διαλύματα**

- **Tris-HCl 200mM (pH 7.4).** Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.
- **Διάλυμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) – TBA (55 mM):** διαλύονται 400 mg TBA μαζί με 14,2g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε 50 ml νερό
- **TCA 35%:** 35 ml από 100% TCA και 65 ml νερό
- **TCA 70%:** 70 ml από 100% TCA και 30 νερό.

### **Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα**

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15ml) προστίθενται 20μL ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος για τα δείγματα και PBS για το τυφλό. Έπειτα, προστίθενται 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl και γίνεται ανάδευση (vortex). Ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται 1mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στο υδατόλουτρο (95 °C). Κατόπιν, τα falcons μεταφέρονται στο ψυγείο όπου παραμένουν για να κρυώσουν για 5 min. Στη συνέχεια, προστίθεται 1mL TCA 70% και πραγματοποιείται ανάδευση. Μεταφέρεται 1mL από τα falcons σε eppendorfs και γίνεται φυγοκέντρηση στα 11200g (10000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 530 nm.

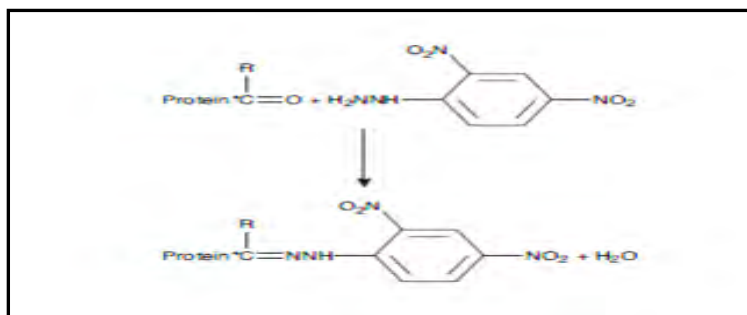
### **3.3.7 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια**

#### **Μέθοδος:**

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεϋδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου C = O αποτελούν μέρος άλλων μεγαλύτερων λειτουργικών ομάδων. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς επηρεάζεται η φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό διασπώνται από το πρωτεόσωμα όμως αν υποστούν πολύ σοβαρές βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών δεν επηρεάζει μόνο τη δική τους λειτουργία αλλά και τη λειτουργία άλλων βιομορίων. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα που επιδιορθώνουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, θα δημιουργηθεί πρόβλημα στην ορθή αντιγραφή του DNA. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου (Patsoukis et al., 2004).



**Εικόνα 15:** Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δινιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δινιτροφαινυλδραζονίου.

### Διαλύματα

- Διάλυμα HCl 2.5N.
- DNPH 14mM. (MB: 198.1)
- Ουρία 5M (pH 2.3). (MB: 60.06)

### Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς και πλάσμα

Σε 20 μl δείγματος (ιστός ή πλάσμα) προστίθενται 380 μl PBS και πραγματοποιείται ανάδευση. Έπειτα, προστίθεται 0,5 ml DNPH στα δείγματα και 0,5 ml HCl 2,5 N στα blank, ενώ ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας προστίθενται 100 μl 100% TCA και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 0,75 ml ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v) , αναδεύονται τα δείγματα (διαλύεται με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρώνονται στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C.

Αυτή η διαδικασία την επαναλαμβάνεται άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνεται το υπερκείμενο.



Προστίθεται 1mL 5 M ουρία (pH 2.3) και μετά γίνεται ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 15 min. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000g για 3 λεπτά στους 4 °C και τέλος, μεταφορά του υπερκείμενου σε κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφηση στα 375 nm.

### **3.4 Western-blot analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων $\gamma$ -GCL, SOD-1 και CAT**

#### **Μέθοδος:**

Η τεχνική Western blotting (ή ανοσοαποτύπωση) είναι μια σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και ανάλυση πρωτεϊνών βασισμένη στην ικανότητα τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Χρησιμοποιώντας την συγκεκριμένη μέθοδο καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα μίγμα πρωτεϊνών που εξάγεται από κύτταρα. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τρεις συνιστώσες για να ολοκληρωθεί: 1) διαχωρισμός βάσει μεγέθους, 2) μεταφορά σε στερεό υπόστρωμα και 3) σήμανση της πρωτεΐνης με το κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα. Στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, το μίγμα της πρωτεΐνης εφαρμόζεται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE, native PAGE, ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων) για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το φορτίο ή άλλες διαφορές στις επιμέρους πρωτεϊνικές ζώνες. Οι διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης, PVDF). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται στύπωση. Οι πρωτεΐνες προσκολλώνται στη μεμβράνη με το ίδιο μοτίβο όπως είχαν διαχωριστεί. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες είναι προσβάσιμες στην πρόσδεση αντισωμάτων για ανίχνευση.

#### **Πειραματικό πρωτόκολλο για ιστούς**

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της SOD-1, της CAT και της  $\gamma$ -GCL χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. 30  $\mu$ g πρωτεΐνης του ολικού ιστού χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της SOD-1, της CAT και της  $\gamma$ -GCL. Στον ιστό προστίθεται 6×Loading buffer και ακολουθεί θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού για 3 min. Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα “φορτώνονται” και διαχωρίζονται σε 8% SDS-PAGE πηκτή ακρυλαμίδης για 45-60 min με τάση ρεύματος 150 V. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη: στο πρώτο τμήμα ή πηκτή πακεταρίσματος (stacking gel), όπου

πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν. Η πηκτική πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 0.5 M pH 6.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Στο δεύτερο τμήμα ή πηκτική διαχωρισμού (separating gel) (ddH<sub>2</sub>O, Tris 1.5 M pH 8.8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων από την πηκτική ακρυλαμίδου σε μεμβράνη (PVDF). Συγκεκριμένα, το πήκτωμα τοποθετείται μέσα σε μία κασετίνα που περιέχει τα εξής υλικά με την ακόλουθη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί Whatman, το πήκτωμα και από πάνω τη μεμβράνη PVDF, διηθητικό χαρτί Whatman και σφουγγαράκι. Η κασετίνα τοποθετείται σε μια ειδική θήκη μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται για 2 h με τάση ρεύματος τα 110 V. Μετά την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης στους 4 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται για 1 h με τα πρωτογενή αντισώματα (anti-SOD-1, αραιώση 1:600; anti-γ-GCL, αραιώση 1:600; anti-CAT, αραιώση 1:400) σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 min η καθεμία με το διάλυμα 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-rabbit, αραιώση 1:5000; anti-goat, αραιώση 1:3000) για 30 min σε διάλυμα 1× TBST (10 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης με ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 min της μεμβράνης με το διάλυμα 1× TBST. Ύστερα, η μεμβράνη εκτίθεται στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για 1 min και η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας ευαίσθητο στο μπλε φως (Kodak X-OMAT AR και Kodak Biomax XAR film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control. Το ποσό του ανοσοδραστικού προϊόντος σε κάθε γραμμή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Alpha Innotech.

### 3.5 Real-time PCR (*sod1, gclc, cat*)

#### 3.5.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικού kit. Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει λύση κυττάρων με τη χρήση lysis buffer-μερκαπτοαιθανόλης, κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση αιθανόλης, κατακράτηση νουκλεϊκών οξέων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη και προσθήκη νερού για συλλογή RNA και DNA. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην συλλογή τόσο RNA όσο και DNA λόγω του αρνητικού τους φορτίου.

Το επόμενο βήμα μετά τη συλλογή των νουκλεϊκών οξέων είναι η μετατροπή του mRNA σε cDNA. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στη χρήση των oligo-dTs, τα οποία συνδέονται πάνω στην poly(A) ουρά των mRNA και η αντίστροφη μεταγραφή επιμηκώνει την αλυσίδα προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα απέναντι από τα ριβονουκλεϊκά οξέα της μήτρας.

#### 3.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων

##### Μέθοδος:

Η real-time PCR είναι μία εργαστηριακή τεχνική βασισμένη στη μέθοδο της PCR. Πρόκειται για μία καθιερωμένη τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης γονιδίων.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η τεχνική της real-time PCR με τη χρήση της SYBR-Green. Η SYBR-Green είναι μία χρωστική που διαθέτει την ικανότητα να προσδένεται πάνω σε δίκλωνο DNA. Με τη σύνδεση της πάνω στο DNA, εκπέμπει φθορισμό. Η χρωστική αυτή απορροφά στα 492nm και εκπέμπει στα 516nm.

Στα αρχικά στάδια της PCR, ο φθορισμός που εκπέμπεται από την SYBR-Green είναι αδύναμος και δεν ξεπερνάται η ουδός που απαιτείται (Ct – Cycle Threshold). Το Ct είναι ανάλογο του λογαρίθμου της αρχικής ποσότητας DNA του δείγματος. Κατά την εκθετική φάση της PCR, ο φθορισμός διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Μετά τον 35ο κύκλο περίπου, η ένταση του σήματος φτάνει σε plateau, υποδεικνύοντας ότι έχει επέλθει κορεσμός στην PCR (Ponchel et al. 2003).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της real-time PCR περιλαμβάνει κανονικοποίηση. Η κανονικοποίηση ως προς ένα γονίδιο αναφοράς είναι μία απλή μέθοδος για τον έλεγχο εσωτερικών σφαλμάτων της real-time PCR. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς ένα housekeeping γονίδιο (γονίδιο αναφοράς). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου αποτελεί το GAPDH (αφυδρογονάση

της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). Η έκφραση αυτών των γονιδίων βρίσκεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς και παραμένει ανεπηρέαστη από εξωτερικούς παράγοντες (Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005).

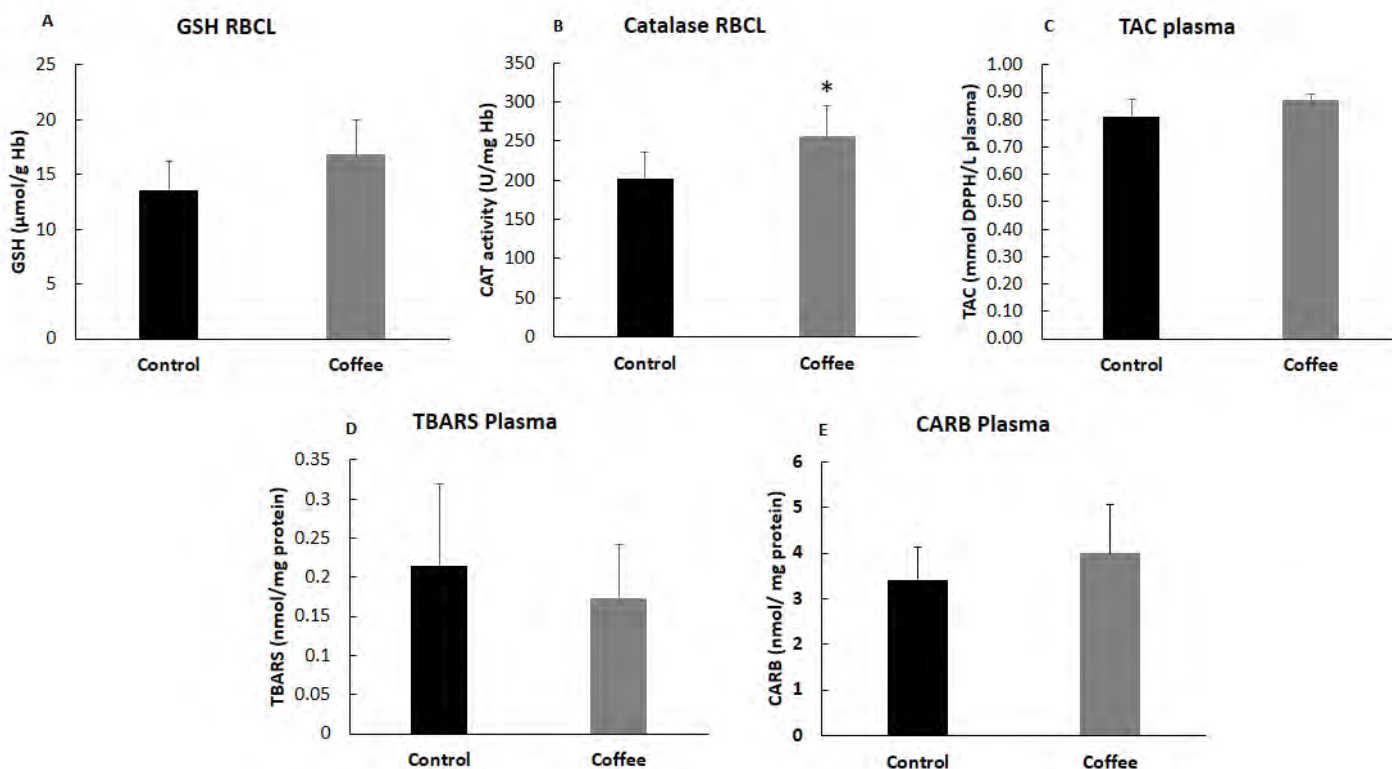
### **3.6 Στατιστική Ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος λογισμικού SPSS 20.0. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA με στάθμη σημαντικότητας το  $p < 0,05$ .

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

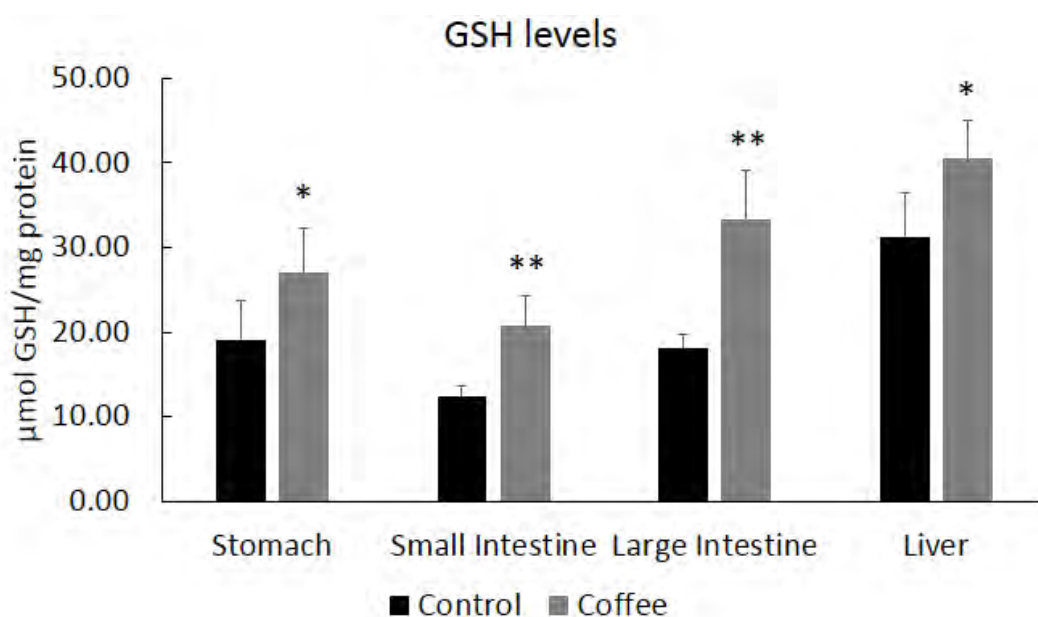
#### 4.1.1 Πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα



**Διάγραμμα 1:** **A)** Σύγκριση επιπέδων γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα μεταξύ αρουραίων αρνητικών μαρτύρων (*control*) και αρουραίων που κατανάλωσαν καφέ, **B)** Σύγκριση δραστηριότητας καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα μεταξύ των δύο ομάδων πειραματόζωων, **C)** Σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος, **D)** Σύγκριση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στο πλάσμα, **E)** Σύγκριση επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα.

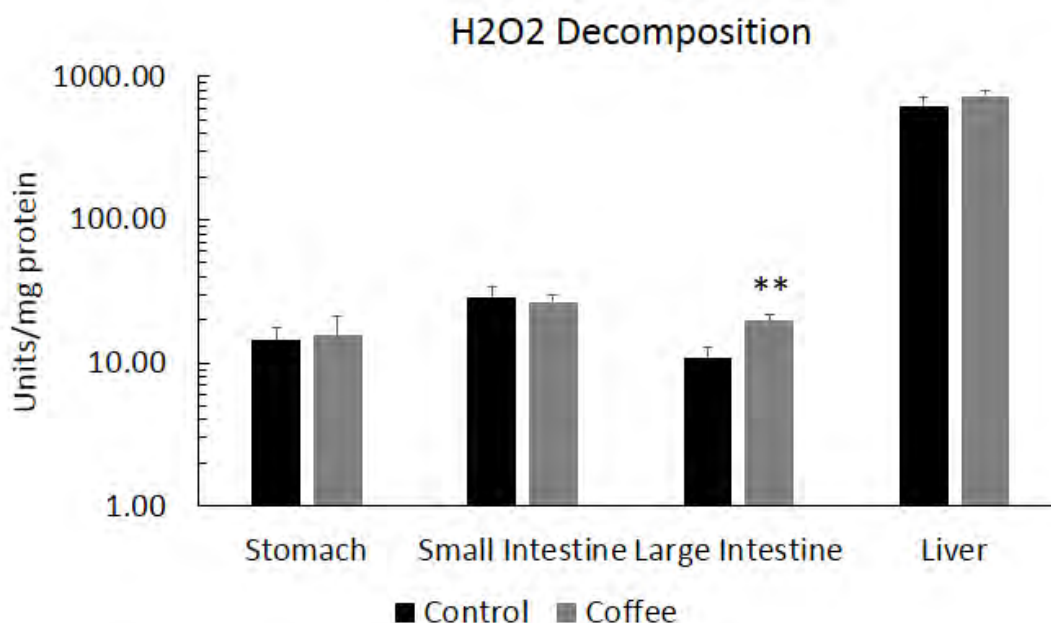
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1, η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά στο αίμα, συγκεκριμένα στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (RBCL), παρατηρήθηκε στη δραστηριότητα της καταλάσης η οποία αυξήθηκε από τον καφέ κατά 26%. Σε όλους τους άλλους δείκτες παρατηρήθηκε αύξηση στους αρουραίους που κατανάλωσαν καφέ σε σχέση με τους αρουραίους-control εκτός από το δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης όπου παρατηρήθηκε μείωση. Παρόλα αυτά, οι διαφορές σε αυτούς τους δείκτες δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές.

#### 4.1.2 Ιστοί (στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ)



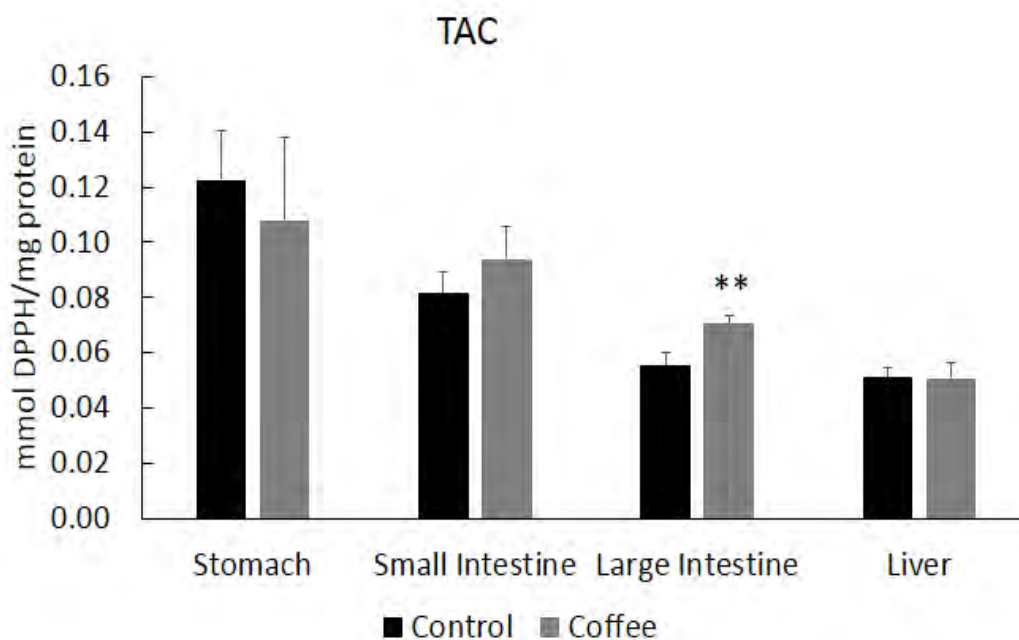
**Διάγραμμα 2:** Σύγκριση των επιπέδων της γλουταθειόνης στους 4 ιστούς: στόμαχος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, ήπαρ.

Η κατανάλωση καφέ οδήγησε σε σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς, ένα πολύ σημαντικό εύρημα, καθώς πρόκειται για το σημαντικότερο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο. Αναλυτικότερα, στον στόμαχο αυξήθηκε κατά 41%, στο λεπτό έντερο κατά 67%, στο παχύ έντερο κατά 84% και στο ήπαρ κατά 29% (Διάγραμμα 2).



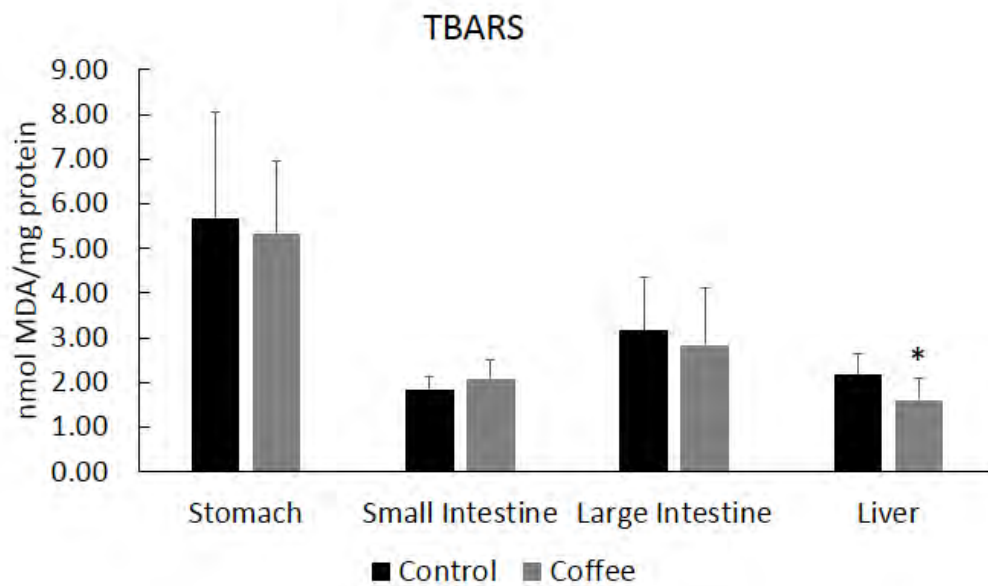
**Διάγραμμα 3:** Σύγκριση της ικανότητας διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους 4 ιστούς

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζεται η ικανότητα διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Πρόκειται για μια από τις σημαντικότερες μορφές ROS που παράγεται συνεχώς εντός του οργανισμού και η διάσπαση του καταλύεται από ένζυμα όπως η καταλάση και οι περοξειρεδοξίνες. Σε έναν ιστό μόνο (Παχύ έντερο) παρατηρήθηκε αύξηση στην ικανότητα διάσπασης κατά 80%, γεγονός που υποδηλώνει βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.



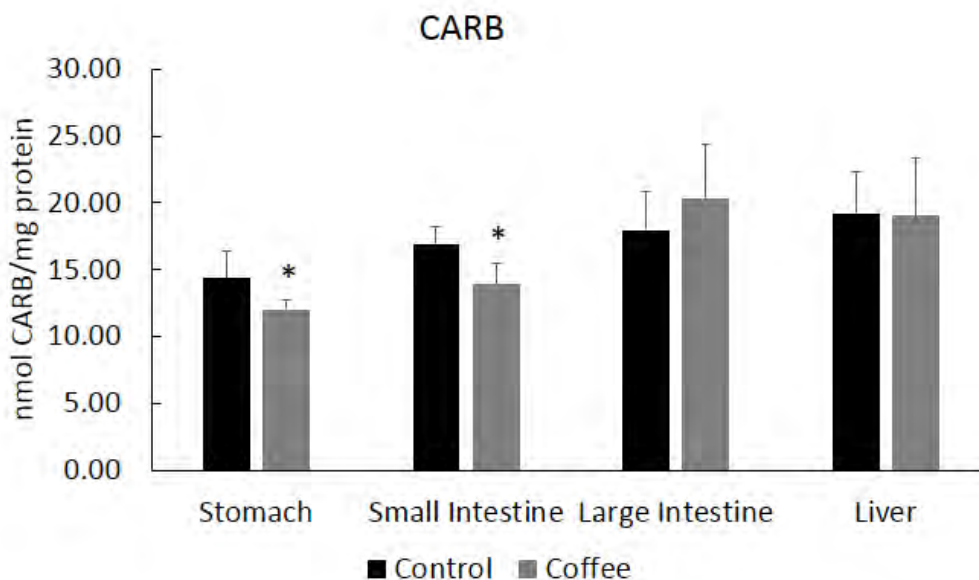
**Διάγραμμα 4:** Σύγκριση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους 4 ιστούς

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αντικατοπτρίζει την συνολική ικανότητα ενός ιστού να εξουδετερώνει μια ρίζα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4, μόνο το παχύ έντερο παρουσίασε αυξημένη TAC έπειτα από κατανάλωση καφέ. Αναλυτικότερα, στο παχύ έντερο η αύξηση ανέρχεται στο 28%.



**Διάγραμμα 5:** Σύγκριση της λιπιδικής υπεροξειδωσης μεταξύ control και αρουραίων που κατανάλωσαν καφέ στους 4 ιστούς.

Ο καφές μείωσε τα επίπεδα οξείδωσης των λιπιδίων, με εξαίρεση το λεπτό έντερο όπου παρατηρείται ασθενής αύξηση (Διάγραμμα 5). Όμως, η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά του καφέ σε σχέση με το control βρέθηκε στο ήπαρ και αντιστοιχεί σε μείωση κατά 26%.



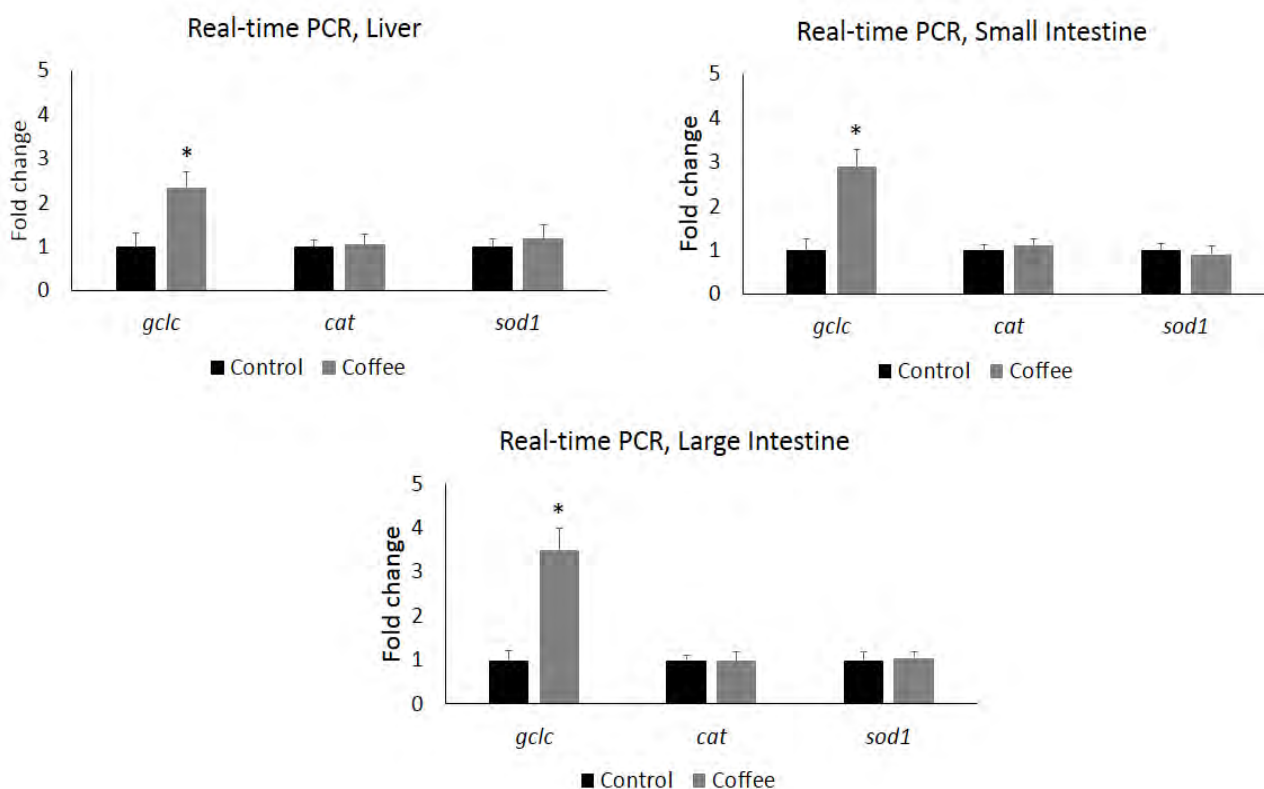
**Διάγραμμα 6:** Σύγκριση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους 4 ιστούς

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συγκεκριμένα, στατιστικά



σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στον στόμαχο και στο λεπτό έντερο, όπου παρατηρήθηκε μείωση της οξειδωσης των πρωτεϊνών από τον καφέ κατά 16% και 18%, αντίστοιχα.

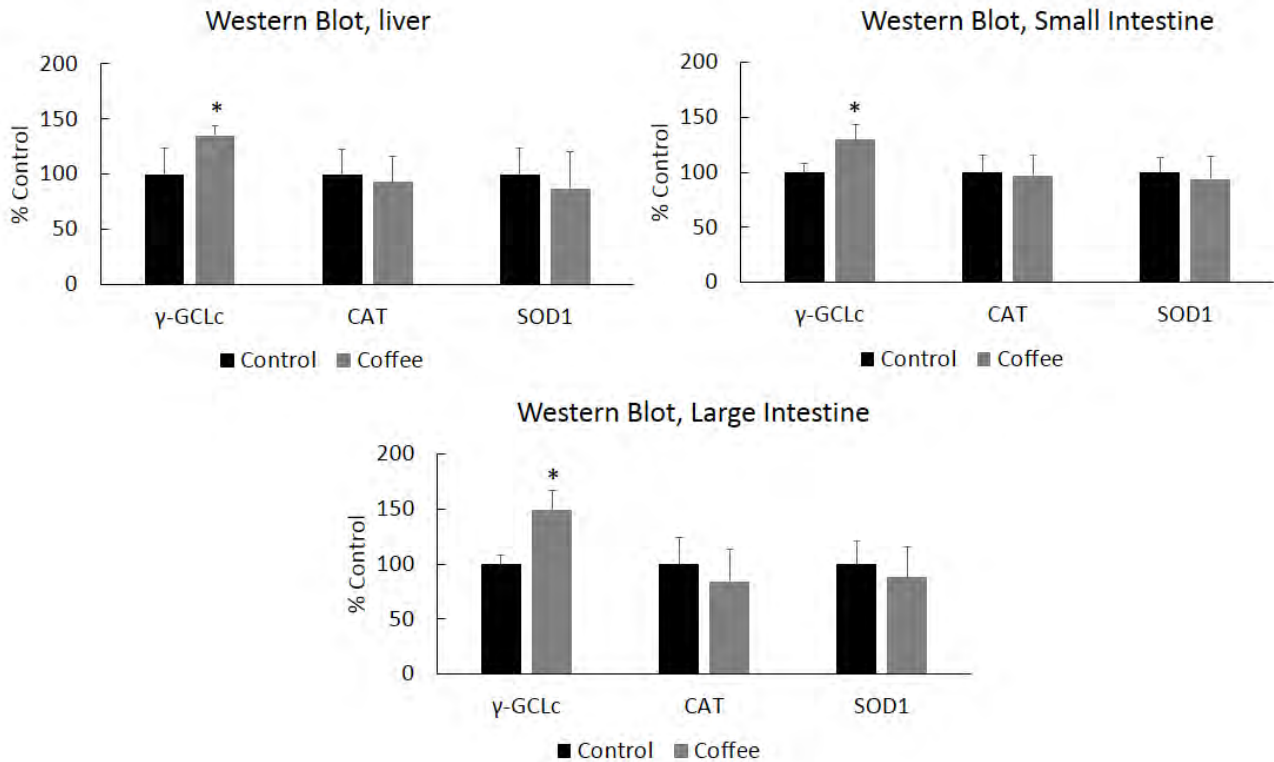
## 4.2 Real-time PCR (sod1, gclc, cat)



**Διάγραμμα 7:** Αποτελέσματα της Real-Time PCR για τα γονίδια *gclc*, *cat* και *sod1* στους 3 υπό μελέτη ιστούς (ήπαρ, λεπτό έντερο, παχύ έντερο).

Στην Real-Time PCR εξετάστηκαν οι τρεις από τους τέσσερις ιστούς, δηλαδή το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο και το ήπαρ, όπως και στη μέθοδο Western-blot για την έκφραση των πρωτεϊνών. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο γονίδιο της  $\gamma$ -GCL (*gclc*), του οποίου η έκφραση φάνηκε να αυξήθηκε από τον καφέ κατά 2.3 φορές στο ήπαρ, κατά 2.9 φορές στο λεπτό έντερο και 3.5 φορές στο παχύ έντερο (Διάγραμμα 7).

### 4.3 Western-blot Analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων $\gamma$ -GCL, SOD-1 και CAT



**Διάγραμμα 8:** Αποτελέσματα της τεχνικής Western-blot για τα επίπεδα των πρωτεϊνών  $\gamma$ - GCL, CAT και SOD1 στους 3 υπό μελέτη ιστούς (ήπαρ, λεπτό έντερο, παχύ έντερο).

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8, στους 3 ιστούς που μελετήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών  $\gamma$ - GCL, CAT και SOD1 η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης αφορά την  $\gamma$ - GCL. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή αυξήθηκε κατά 35 % στο ήπαρ, κατά 29 % στο λεπτό έντερο και κατά 50 % στο παχύ έντερο. Οι άλλες δύο πρωτεΐνες δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές, αποτέλεσμα που συνάδει με τα ευρήματα της Real-Time PCR για τα επίπεδα mRNA.

## 5. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με τη μελέτη της δραστηριότητας του καφέ, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως λόγω των μοναδικών οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Λόγω της φυτικής τους προέλευσης, οι κόκκοι του καφέ περιέχουν πολυάριθμα πιθανά βιοδραστικά συστατικά, μεταξύ των οποίων το χαρακτηριστικό αλκαλοειδές καφεΐνη, κάποια διτερπένια, όπως, επίσης, και πολυφαινόλικά μόρια με βασικότερα τα χλωρογενικά οξέα. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του καφέ είναι η επεξεργασία που υφίστανται οι κόκκοι του ώστε να πραγματοποιηθεί η παρασκευή του ροφήματος. Αναλυτικότερα, οι πράσινοι κόκκοι καβουρδίζονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (που υπερβαίνουν τους 200°C) και για καθορισμένα χρονικά διαστήματα ανάλογα τον τύπο του ροφήματος. Με την ανάπτυξη τόσο υψηλών θερμοκρασιών πραγματοποιούνται διάφορες διεργασίες στον κόκκο που τροποποιούν τη σύσταση και τις ιδιότητές του, με σημαντικότερες τις αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης τύπου Maillard. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν στη δημιουργία νέων ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται μελανοΐδινες. Τα μόρια αυτά είναι πιθανό εμφανίζουν βιοδραστικότητα, προσδίδοντας στον καβουρδισμένο κόκκο διαφορετικές ιδιότητες από τον πράσινο.

Έχουν διεξαχθεί ποικίλες έρευνες για το ρόφημα του καφέ κι ενώ κάποιες έχουν δείξει ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία, σε άλλες αυτές δεν ήταν εμφανείς (Frost-Meyer & Logomarsino, 2012; Natella, Nardini, Belevi, & Scaccini, 2007). Οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν είτε απευθείας χορήγηση του ροφήματος σε ανθρώπους είτε *in vitro* πειράματα που μελετούσαν την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Όμως, δεν υφίστανται πολλά δεδομένα για το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ.

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εξέτασε την επίδραση ενός εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση στο αίμα και σε τέσσερις ιστούς επίμυων. Το εκχύλισμα που χορηγήθηκε, επιλέχθηκε όντας το ισχυρότερο σε μία σειρά *in vitro* πειραμάτων που προηγήθηκαν (Priftis et al., 2015; Priftis, Goutzourelas, et al., 2017; Priftis, Mitsiou, et al., 2018; Priftis et al., 2018; Priftis, Papikinos, et al., 2017; Priftis, Angeli-Terzidou, Veskoukis, Spandidos, & Kouretas, 2018).

Ο καφές χορηγήθηκε για δύο εβδομάδες στο νερό των επίμυων σε δόση που αντιστοιχεί σε ημερήσια κατανάλωση 3-4 καφέδων στον άνθρωπο. Οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν ο στόμαχος, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο και το ήπαρ, με λίγα λόγια το μεγαλύτερο μέρος του γαστρεντερικού συστήματος καθώς και το ήπαρ το

οποίο αποτελεί το βασικό όργανο αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού του οργανισμού. Με βάση τα αποτελέσματα, οι επίμυες που κατανάλωσαν καφέ εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και στους τέσσερις αυτούς ιστούς κατά 29-84 %, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στο παχύ έντερο. Το εύρημα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό διότι η ανηγμένη γλουταθειόνη, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι το σημαντικότερο μη ενζυμικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο αίτια. Πρώτον, είναι πιθανό τα αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ να αντικαθιστούν τη γλουταθειόνη και να αντιμετωπίζουν εκείνα τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα η ποσότητά της να παραμένει υψηλή. Δεύτερον, είναι εξίσου πιθανό να προκαλείται αύξηση της βιοσύνθεσης του τριπεπτιδίου λόγω αυξημένης έκφρασης των ενζύμων που την καταλύουν.

Επιπροσθέτως, στο δεύτερο δείκτη οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκε (ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου), παρατηρήθηκε αύξηση μόνο στο παχύ έντερο κατά 80 %. Ο συγκεκριμένος δείκτης αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα δύο κατηγοριών ενζύμων, της καταλάσης και των περοξυρεδοξινών. Η μοναδική αύξηση που εντοπίστηκε πιθανώς συσχετίζεται με το γεγονός ότι το 70 % των βιοδραστικών χλωρογενικών οξέων του καφέ δεν απορροφώνται και καταλήγουν στο παχύ έντερο, επομένως θεωρητικά ήταν ο ιστός που αναμενόταν να δέχεται την ισχυρότερη επίδραση.

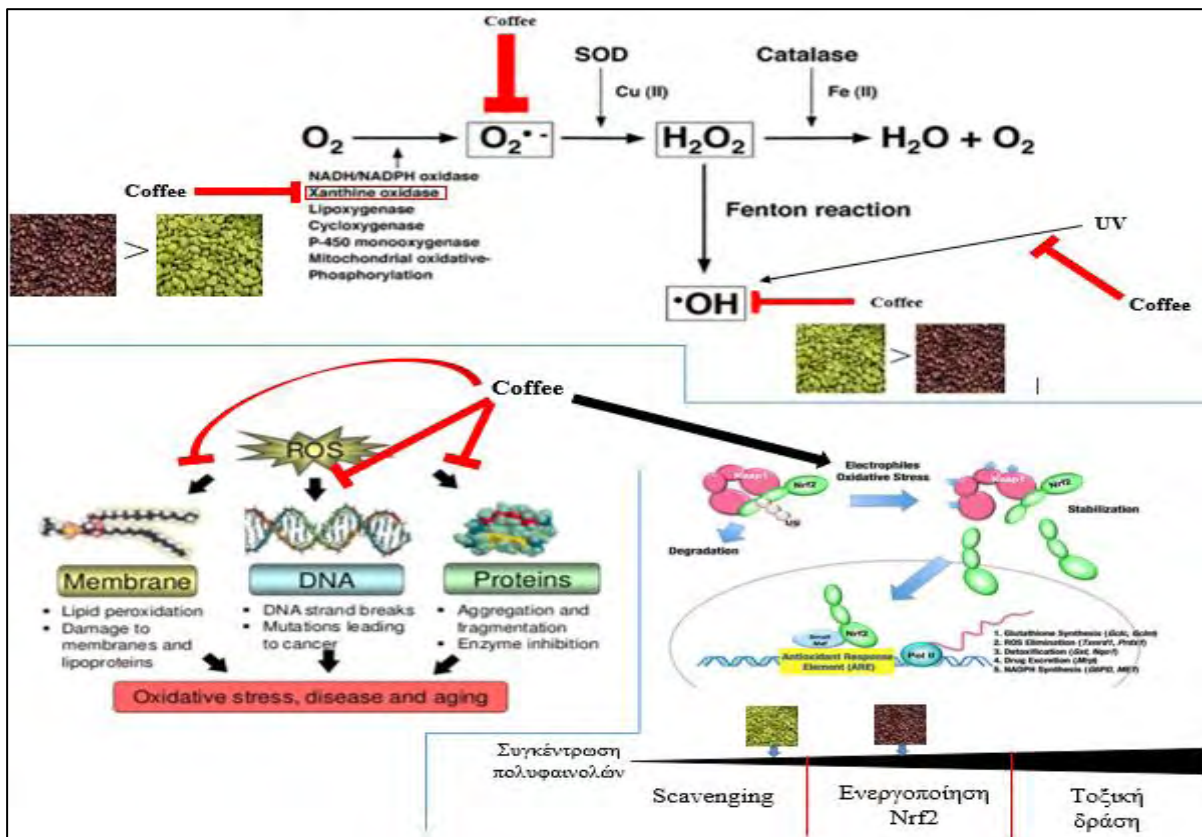
Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και εδώ η μοναδική στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στο παχύ έντερο (αύξηση κατά 28 %). Με βάση τους τρεις παραπάνω δείκτες επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι στο παχύ έντερο εμφανίζεται ισχυρότερη επίδραση του εκχυλίσματος καφέ.

Ως προς τους δύο δείκτες οξείδωσης μακρομορίων (TBARS, CARB), τα δεδομένα διαφοροποιούνται. Στη μεν οξείδωση λιπιδίων παρατηρήθηκε διαφορά μόνο στο ήπαρ (μείωση 26 %), στη δε οξείδωση πρωτεϊνών εντοπίστηκε μείωση στο στόμαχο και στο λεπτό έντερο κατά 16 % και 18 %, αντίστοιχα. Έτσι λοιπόν φαίνεται πως στο γαστρεντερικό σύστημα όταν οι ενώσεις του καφέ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζουν προστατευτική επίδραση έναντι της οξείδωσης πρωτεϊνών. Ωστόσο, στο παχύ έντερο όπου και αυξάνεται η συγκέντρωση είναι πιθανό να εμφανίζεται το προοξειδωτικό φαινόμενο των πολυφαινολών ( κάτι που συμβαδίζει με την παρατηρούμενη επαγωγή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε αυτό τον ιστό), γεγονός που οδηγεί σε απώλεια προστασίας των πρωτεϊνών. Από την άλλη, έπειτα από

την απορρόφηση τους, τα συστατικά του καφέ καταλήγουν στο αίμα, στο ήπαρ και από εκεί σε όλους τους υπόλοιπους ιστούς. Στο ήπαρ πραγματοποιείται και ο μεταβολισμός τους και αυτό φαίνεται να επηρεάζει το μοτίβο δράσης, καθώς παρατηρείται προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης μόνο των λιπιδίων και όχι των πρωτεϊνών.

Πέρα των ιστών, μελετήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης του καφέ και στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος. Η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στην δραστηριότητα της καταλάσης (στα ερυθροκύτταρα υπερισχύει η καταλάση έναντι των περοξυρεδοξινών ως προς την αποικοδόμηση υπεροξειδίου του υδρογόνου), η οποία αυξήθηκε κατά 26 %. Καθώς τα ώριμα ερυθροκύτταρα στερούνται πυρήνα, δεν είναι δυνατή η επαγωγή έκφρασης της καταλάσης σε αυτά. Ωστόσο, τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα έχουν ενεργό πυρήνα, έτσι είναι πιθανό ο καφές να επηρέασε την έκφραση καταλάσης σε αυτά, κάτι που μεταφράστηκε στην παρατηρούμενη αύξηση.

Όσον αφορά τον μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ, πρέπει να τονιστεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν πλειοτροπικό τρόπο δράσης, εφόσον μπορούν να έχουν απευθείας αντιοξειδωτική δράση μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών όταν η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλή. Όμως, όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει μια ουδό, τότε τα μόρια αυτά μπορεί να δρουν προ-οξειδωτικά με συνέπεια την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 που οδηγεί στην έκφραση γονιδίων οι οποίες κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η αναστολή των ελευθέρων ριζών από εκχυλίσματα καφέ έχει αναφερθεί σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου που δημοσιεύτηκε ενώ η ενεργοποίηση γονιδίων στόχων αναφέρθηκε σε μια άλλη, επίσης δημοσιευμένη έρευνα (Priftis et al., 2015; Priftis, Angeli-Terzidou, et al., 2018). Τα γονίδια που ενεργοποιήθηκαν (από το ελαφρά καβουρδισμένο δείγμα, Brazil R4) περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων αυτά που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης όντας υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και την ανακύκλωση της, όπως το κύριο ένζυμο βιοσύνθεσης του τριπεπτιδίου, λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL) και την αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR). Επιπλέον, βρέθηκε αύξηση της έκφρασης της NAD(P)H αφυδρογονάσης κινονών 1 (NQO1), ένα ένζυμο που εξουδετερώνει κινόνες, προστατεύοντας έτσι από την οξείδωση μακρομορίων, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD1) και η θειορεδοξίνη 1 (Trx1), δυο ακόμα σημαντικά ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση της ρίζας σουπεροξειδίου και την αναγέννηση οξειδοαναγωγικών ενζύμων αντίστοιχα.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ.

Στην προκειμένη περίπτωση, αποτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης (τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης) της καταλάσης (CAT), της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD1) και της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL). Και τα τρία αυτά γονίδια είναι στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε, φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον μηχανισμό δράσης του καφέ. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν το λεπτό και παχύ έντερο καθώς και το ήπαρ, καθώς σε αυτούς τους ιστούς παρατηρήθηκε η ισχυρότερη επίδραση έπειτα από κατανάλωση καφέ.

Ως προς τα επίπεδα mRNA των τριών αντιοξειδωτικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR στους τρεις ιστούς που επιλέχθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως και στις τρεις περιπτώσεις υπήρξε αύξηση έκφρασης του γονιδίου *gclc* κατά 2.3 φορές στο ήπαρ, κατά 2.9 φορές στο λεπτό έντερο και κατά 3.5 φορές στο παχύ έντερο. Στα άλλα δυο γονίδια δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή των επιπέδων μεταγραφής. Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η αύξηση των επιπέδων μεταγραφής συνοδεύεται και από αύξηση των επιπέδων μετάφρασης

πραγματοποιήθηκε η τεχνική Western blot. Από την τεχνική αυτή προέκυψε ότι η γ-GCL αυξήθηκε κατά 35 % στο ήπαρ, κατά 29 % στο λεπτό έντερο και κατά 50 % στο παχύ έντερο. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Real-Time PCR τα επίπεδα καταλάσης και δισμουτάσης του σουπεροξειδίου δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά.

Συνολικά, η κατανάλωση καφέ οδήγησε σε βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, που μεταφράστηκε κυρίως σε αυξημένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (λόγω αυξημένης βιοσύνθεσής της). Ακόμα, παρατηρήθηκε μείωση της οξείδωσης λιπιδίων ή/και πρωτεϊνών, γεγονός που σε συνδυασμό με το παραπάνω επιδεικνύει την ευεργετική επίδραση του συγκεκριμένου ροφήματος έπειτα από μέτρια κατανάλωση. Επιπροσθέτως, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στο γαστρεντερικό σύστημα καθώς εκεί (και δη στο παχύ έντερο) εδράζει ένα μεγάλο μέρος της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας. Καθώς το μεγαλύτερο μέρος των πολυφαινολών καταλήγουν στο παχύ έντερο και οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν εμφανίσει αντιμικροβιακές ιδιότητες και προοξειδωτική δράση, θα ήταν πιθανό να επηρεάζουν την ομοιόσταση του ιστού. Ωστόσο, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του παχέος εντέρου βελτιώθηκε, χωρίς να παρατηρούνται οξειδωτικές επιδράσεις.

Η συγκεκριμένη μελέτη στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου που παρουσιάζουν την ικανότητα ποικίλων φυτικών εκχυλισμάτων να δράσουν προστατευτικά για ορισμένα κυτταρικά μακρομόρια, παρεμποδίζοντας οξειδωτικές βλάβες και εμφανίζοντας, έτσι, χημειοπροστατευτική δραστηριότητα (N. Goutzourelas et al., 2015; Νικόλαος Goutzourelas et al., 2015; Kerasioti et al., 2014, 2016; Spanou et al., 2008).

Το σύνολο των παραπάνω ερευνών προσφέρουν μια εικόνα για το πόσο σημαντικοί είναι οι διατροφικοί παράγοντες στη βελτίωση της λειτουργίας του οργανισμού, ωστόσο πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα και ο μεταβολισμός του κάθε πιθανού βιολειτουργικού μορίου. Συγκεκριμένα, στον καφέ οι κύριες βιολειτουργικές ενώσεις είναι τα χλωρογενικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν βιοδιαθεσιμότητα που αγγίζει το 30% σύμφωνα με μελέτες (Del Rio et al., 2010; Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, 2008). Αυτό το ποσοστό είναι αρκετά υψηλό για τα δεδομένα των πολυφαινολών, γεγονός που τονίζει την πιθανή σημαντικότητα του καφέ ως μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών, πέρα από μια καθημερινή συνήθεια.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρεται στις ευεργετικές επιπτώσεις της χορήγησης καφέ σε ζωικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με μια μελέτη, η κατανάλωση καφέ στο νερό (που αντιστοιχεί σε 2 καφέδες φίλτρου ή 6 εσπρέσσο ημερησίως) βελτίωσε δείκτες ηπατικής λειτουργίας σε ένα μοντέλο στεατοηπατίτιδας σε αρουραίους (Vitaglione et al., 2010). Σε άλλη μελέτη, βρέθηκε πως η κατανάλωση στέρεου καφέ προκάλεσε επαγωγή ενζύμων αποτοξικοποίησης (GSTs) μέσω ενεργοποίησης του Nrf2 στο ήπαρ αρουραίων (Cavin et al., 2008). Τέλος, σε μια τρίτη έρευνα, φάνηκε πως ο καφές επάγει ακόμα ένα ένζυμο που συμμετέχει στον μεταβολισμό και την αποτοξικοποίηση, την γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση (UGT) στο ήπαρ και τον στόμαχο ποντικών (Kalthoff, Ehmer, Freiberg, Manns, & Strassburg, 2010). Η UGT προκαλεί την πρόσδεση ενός γλυκουρονιδίου σε μια ένωση, με σκοπό να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα της, ώστε να απεκκριθεί.

Εν κατακλείδι, παρότι παραμένουν αρκετά ερωτήματα σχετικά με το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ, η διεξαγωγή ερευνών όπως η συγκεκριμένη είναι ιδιαίτερα σημαντική με σκοπό να διευκρινιστεί η επίδραση του καφέ σε κάθε ιστό ενός ζωντανού οργανισμού ξεχωριστά. Σε αντίθεση με ένα *in vitro* πείραμα, το *in vivo* λαμβάνει υπόψιν τόσο τη βιοδιαθεσιμότητα όσο και τον μεταβολισμό και την απέκκριση των ουσιών που εξετάζονται, δίνοντας έτσι μια πλήρη εικόνα σχετικά με την επίδραση που έχουν αυτές στη φυσιολογία ολόκληρου του οργανισμού.



## 6. Βιβλιογραφία

- Calabrese, E. J. (2004). Hormesis: from marginalization to mainstream. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2), 125–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.007>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Cavin, C., Marin-Kuan, M., Langouët, S., Bezençon, C., Guignard, G., Verguet, C., ... Schilter, B. (2008). Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1239–1248.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.099>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. (2004a). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(2), 192–208.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004b). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*.  
<https://doi.org/10.3390/nu2080820>
- 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), 2309–2315.  
<https://doi.org/10.3945/jn.108.095554>
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and

- modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Frost-Meyer, N. J., & Logomarsino, J. V. (2012). Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *Journal of Functional Foods*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.010>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Housmekeridou, A., Karapoulou, C., Kerasioti, E., Aligiannis, N., ... Kouretas, D. (2015). Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(2), 433–441.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2246>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., ... Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279–284.  
<https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 62(3), 231–236.
- Kalthoff, S., Ehmer, U., Freiberg, N., Manns, M. P., & Strassburg, C. P. (2010). Coffee Induces Expression of Glucuronosyltransferases by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Nrf2 in Liver and Stomach. *Gastroenterology*, 139(5), 1699–1710.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.048>
- Keles, M., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (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), 141–143.

- Kerasiotti, E., Stagos, D., Georgatzi, V., Bregou, E., Priftis, A., Kafantaris, I., & Kouretas, D. (2016). Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 6585737. <https://doi.org/10.1155/2016/6585737>
- Kerasiotti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chemistry*, 155, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.066>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880589>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2015). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu8010016>
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Ludwig, I. A., Clifford, M. N., Lean, M. E. J., Ashihara, H., & Crozier, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.*, 5(8), 1695–1717. <https://doi.org/10.1039/C4FO00042K>
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>
- Merry, T. L., & Ristow, M. (2016). Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *Journal of Physiology*, 594(18), 5135–5147. <https://doi.org/10.1113/JP270654>
- Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), 903–915. <https://doi.org/10.1039/C2FO30048F>
- Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., & Scaccini, C. (2007). Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 604–609. <https://doi.org/86/3/604> [pii]

- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Priftis, A., Angeli-Terzidou, A.-E., Veskoukis, A. S., Spandidos, D. A., & Kouretas, D. (2018). Cellspecific and roastingdependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 8325–8331. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8924>
- Priftis, A., Goutzourelas, N., Halabalaki, M., Ntasi, G., Stagos, D., Amoutzias, G. D., ... Kouretas, D. (2017). Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.015>
- Priftis, A., Mitsiou, D., Halabalaki, M., Ntasi, G., Stagos, D., Skaltsounis, L. A., & Kouretas, D. (2018). Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mutation Research*, 829–830, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.03.003>
- Priftis, A., Panagiotou, E.-M., Lakis, K., Plika, C., Halabalaki, M., Ntasi, G., ... Kouretas, D. (2018). Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 114, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.029>

- Priftis, A., Papikinos, K., Koukoulanaki, M., Kerasioti, E., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., ... Kouretas, D. (2017). Development of an assay to assess genotoxicity by particulate matter extract. *Molecular Medicine Reports*, *15*(4), 1738–1746. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6171>
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 7293–7302. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>
- Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, *296*(1), 295–309. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3458>
- Radak, Z., Ishihara, K., Tekus, E., Varga, C., Posa, A., Balogh, L., ... Koltai, E. (2017). Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.015>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sea, K., Sohn, S. H., Durazo, A., Sheng, Y., Shaw, B. F., Cao, X., ... Valentine, J. S. (2015). Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(4), 2405–2418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588798>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *5*(3), 237–245.
- Spanou, C., Bourou, G., Dervishi, A., Aligiannis, N., Angelis, A., Komiotis, D., ... Kouretas, D. (2008). Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 6967–6976. <https://doi.org/10.1021/jf800842p>
- Sue, G. R., Ho, Z. C., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1–2), 37–56. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(39), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vitaglione, P., Morisco, F., Mazzone, G., Amoruso, D. C., Ribecco, M. T., Romano, A., ... D'Argenio, G. (2010). Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*, 52(5), 1652–1661. <https://doi.org/10.1002/hep.23902>