



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Επίδραση ποικιλιών καφέ στην οξειδοαναγωγική  
κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων

Effect of coffee varieties on the redox status of myoblasts  
and endothelial cells



Ελευθερία-Μαρία Παναγιώτου

Λάρισα 2016

# Τριμελής Επιτροπή

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Κομιώτης:** Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **Ευχαριστίες:**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για τη βοήθειά του.

## Περιεχόμενα

Τριμελής Επιτροπή .....	1
Ευχαριστίες:.....	2
Περίληψη.....	5
Abstract .....	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.2 Ελεύθερες Ρίζες .....	7
1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species,ROS) .....	8
1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζωτού (RNS) .....	10
1.2.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών.....	11
1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα .....	14
1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	18
1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	19
1.6 Πολυφαινόλες .....	20
1.6.1 Φυσικές Ιδιότητες Πολυφαινολών .....	21
1.6.2 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών .....	21
1.6.4 Φυτικές Πολυφαινόλες – Φυσιολογικός Ρόλος .....	23
1.6.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία .....	24
1.7 Καφές.....	25
2. Σκοπός .....	29
3. Πειραματικό μέρος .....	30
3.1 Αντιδραστήρια .....	30
3.2 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ .....	30
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926 .....	31
3.4 Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλισμάτων καφέ .....	32
3.5 Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS .....	34
4 Αποτελέσματα .....	38
4.1 ΧΤΤ.....	38

4.2 Κυτταρομετρία ροής .....	41
5 Συζήτηση.....	51
6 Βιβλιογραφία.....	58

## 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 χορηγήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις τους σε δυο κυτταρικές σειρές (μυοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα) για να διαπιστωθεί η επίδραση που θα είχαν στην οξειδοαναγωγική κατάσταση τους με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης και αυτά των ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα -αν και παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών- όλα τα εκχυλίσματα βελτίωσαν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων αυξάνοντας τη γλουταθειόνη που είναι το σημαντικότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό και μειώνοντας ελαφρά τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών.

## 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, which are the seeds of berries 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. Initially, polyphenolic extracts were prepared for each sample and the two cell lines that were used (mouse myoblasts and human endothelial cells) were treated with non-cytotoxic concentrations of these extracts to determine their effect on the cell redox status. To be more specific, the levels of glutathione and those of free radicals were measured using flow cytometry. Although differences were observed among the two cell lines, the results showed that all the extracts improved the redox status of cells by increasing glutathione levels, which is the most important non enzymatic endogenous antioxidant, and by reducing, although slightly, free radical levels.

# 1. Εισαγωγή

## 1.2 Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990).

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις).

Ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ενεργειακών συστημάτων να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).



Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών που μπορούν να έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα αλλά και άλλα μόρια.

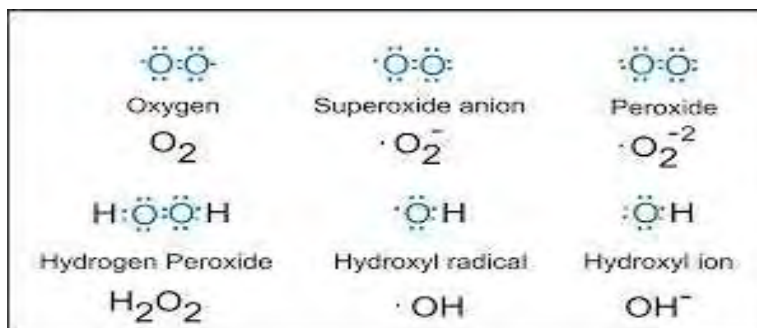
### 1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1:** Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

<b>ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ</b>	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )	Υπεροξειδιο 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 ( $^1O_2$ )

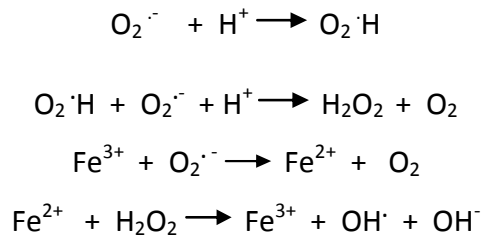
Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



**Εικόνα 1:** Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

**Ανιόν σουπεροξειδίου:** Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου. Είναι ιδιαίτερα τοξικό και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τη οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξολόθρευσης εισβαλόντων παθογόνων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από το σύμπλεγμα I και II. Παράγεται επίσης 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 υπεροξείδιο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

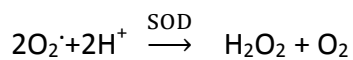
**Ρίζα υδροξυλίου:** Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά

και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

**Υπεροξειδίο υδρογόνου:** Το υπεροξειδίο 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 :



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το OH<sup>·</sup>. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων. Επίσης, σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στον οργανισμό μοντέλο ψάρι ζέβρα που έδειξε ότι μετά από τραυματισμό του τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνονται, έγινε η υπόθεση ότι λειτουργεί σαν σήμα για την προσέλκυση λευκών αιμοσφαιρίων στο σημείο του τραύματος και την εκκίνηση της διαδικασίας επούλωσης (Philipp Niethammer, Clemens Grabher, A. Thomas Look & Timothy J. Mitchison, 2009)

### 1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO<sup>·</sup>) και το διοξειδίο του αζώτου (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>) 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<sub>2</sub>) και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου (ONOO<sup>-</sup>)]

**Πίνακας 2:** Δραστικές Μορφές Αζώτου

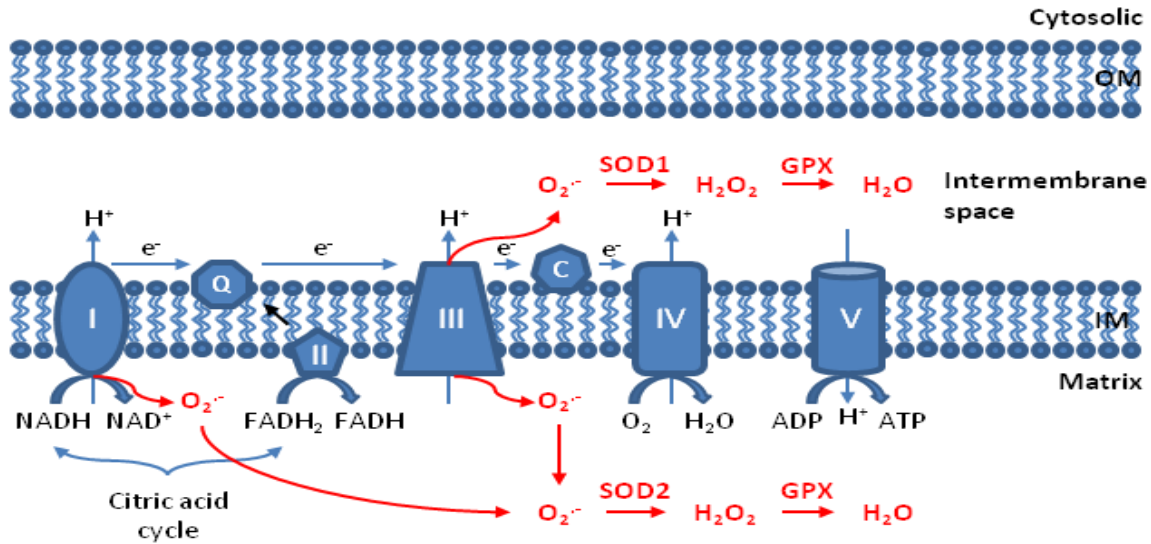
<b>ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ</b>	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO <sup>•</sup> )	Νιτρώδες Οξύ (HNO <sub>2</sub> )
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO <sup>+</sup> )
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO <sup>-</sup> )

### 1.2.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς.

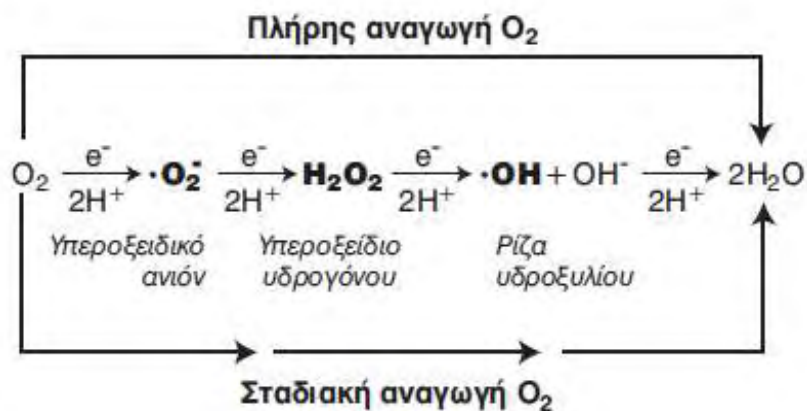
Οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko *et al.* 2006):

**A)** Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή της παραγωγής ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από τη μερική τάση του οξυγόνου και αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση βλάβης στα μιτοχόνδρια (μιτοχονδριακή μεταβολή της διαπερατότητας) με αποτέλεσμα τη μη χρησιμοποίηση της παραγόμενης ενέργειας για τη σύνθεση ATP και τη μεγάλη παραγωγή σουπεροξειδίου που προκαλεί απόπτωση του κυττάρου (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 3: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

**B)** Το υπόλοιπο οξυγόνου που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο (προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο) παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το OH<sup>•</sup> (Παπαγαλάνης 2014).



**Εικόνα 4:** Αναγωγή του μοριακού οξυγόνου εκτός μιτοχονδρίων.

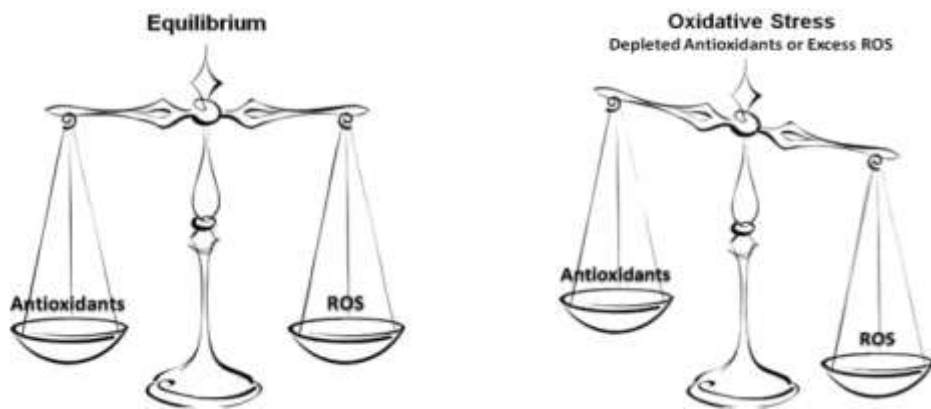
**Γ)** Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

**Δ)** Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Μερικοί από τους εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι: η έκθεση στην ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η επίδραση των βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, κάδμιο, νικέλιο, υδράργυρος, χαλκός), το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης όπως το όζον της τροπόσφαιρας (ισχυρό οξειδωτικό της φωτοχημικής ρύπανσης) το οποίο προκαλεί υπεροξειδωση λιπιδίων και επιδρά στις δράσεις των ενζύμων, καθώς και διάφοροι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και φάρμακα που δρουν με έμμεσο μηχανισμό (ενεργοποίηση κυτοχρώματος P450). Επίσης, ουσίες που περιέχονται στα τσιγάρα, όπως η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξείδιο του άνθρακα προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών που επιδρούν στους πνεύμονες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να αποβεί ακόμα πιο βλαβερός, κάτι που αυξάνει τους κινδύνους και για τους παθητικούς καπνιστές.

### 1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και 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 μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



**Εικόνα 5:** Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί

σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002). Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους.

α) Εμποδίζουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών.

β) Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.

γ) Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).

δ) Δρουν συνεργειακά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

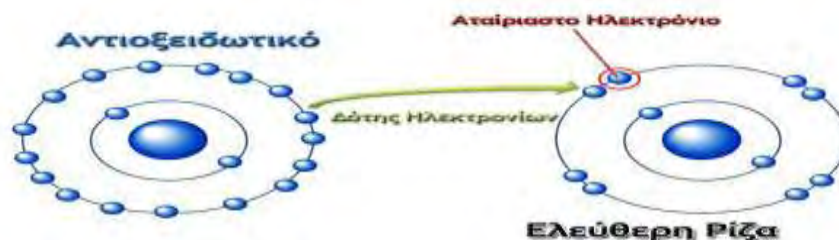
Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgoulialis 2006).



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

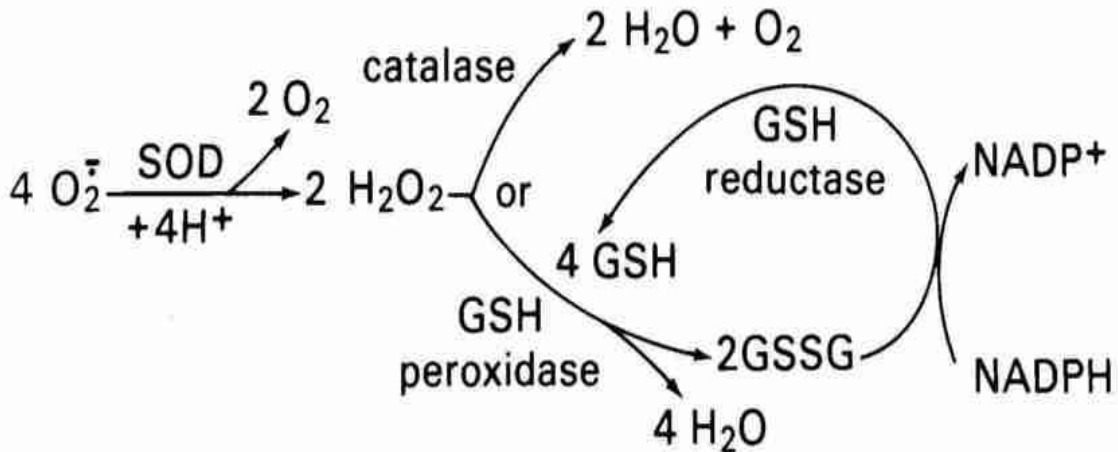
Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10 (Gerogianni & Gourgoulianis 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης η οποία παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^{2-}$  και  $\text{NO}$ . Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak 2011b).



**Εικόνα 6:** Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) μετατρέπει το  $\text{O}_2^{\bullet-}$  σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  και οξυγόνο. Η καταλάση (catalase) με τη σειρά της μετατρέπει το  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH peroxidase) μειώνει την λιπιδική υπεροξειδωση και ανάγει το  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δυο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης. Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GSH reductase) 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 7:** Δράση των ενδογενών, ενζυμικών αντιοξειδωτικών.

Η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργειακή δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η βιταμίνη E 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 πλείστον 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, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

## 1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop 2015).

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler *et al.* 2015). Γενικότερα, σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Valko *et al.* 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak 2011a).



**Εικόνα 8 :** Διαταραχές που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες.

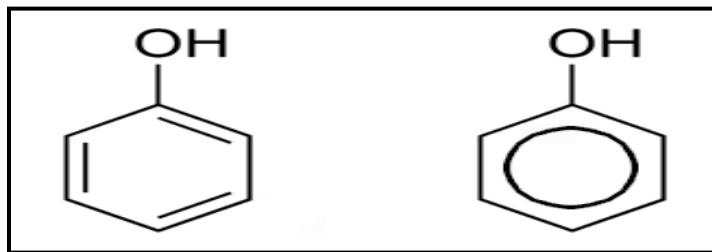
## 1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις πολυάριθμες αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει

συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Celi 2010).

## 1.6 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao 2010). 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 9 :** 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). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

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.

### 1.6.1 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 ίδιου 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.

### 1.6.2 Χημική Δομή Και Τάξεις Πολυφαινολών

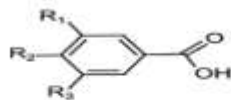
Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Paradouroulou and Frazier 2004).

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 προσδέονται στο δακτυλίου τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

**A) Φλαβονοειδή:** Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly *et al.* 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

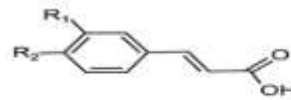
**B) Μη φλαβονοειδή:** Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινναμικού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach *et al.* 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, η βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Οι λιγνάνες περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz 2007). Τα στυλβένια, τέλος, έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου και το πιο γνωστό αυτών είναι μια φυτοαλεξίνη, η ρεσβερατρόλη.

### Hydroxybenzoic acids



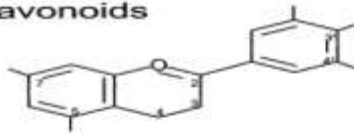
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Gallic acid

### Hydroxycinnamic acids

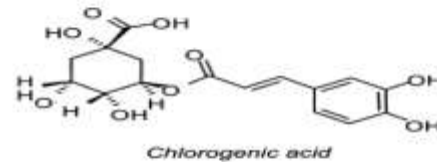


$R_1 = \text{OH}$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Caffeic acid  
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$  : Ferulic acid

### Flavonoids

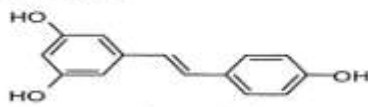


See Figure 2



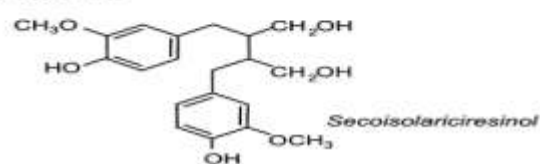
Chlorogenic acid

### Stilbenes



Resveratrol

### Lignans



Secoisolariciresinol

Εικόνα 10 : Είδη πολυφαινόλων.

#### 1.6.4 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 (Manach et al. 2004; Di Carlo et al. 1999; Harborne 1986).



Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών έχουν την ικανότητα να παρέχουν προστασία έναντι της σήψης.

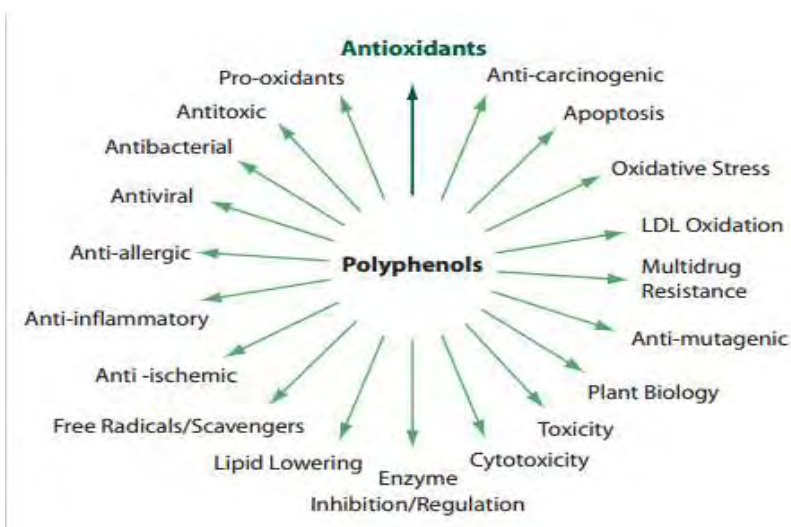
#### 1.6.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχόμενες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen *et al.* 2005).

Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών (συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης), μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, δρουν ως άμεσοι δεσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες δρουν και ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος  $Fe^{2+}$ , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές  $OH^\bullet$ . Επιπρόσθετα, μπορούν να δράσουν ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προοξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσοεξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να δειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί

περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert *et al.* 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo *et al.* 2014; Bouayed *et al.* 2011). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.



**Εικόνα 11 :** Ασθένειες στις οποίες οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική επίδραση.

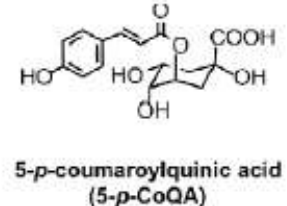
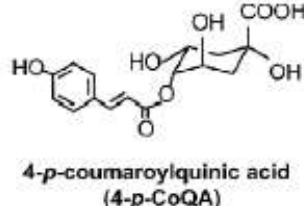
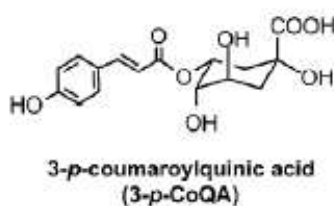
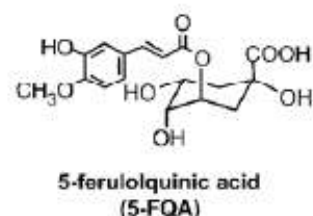
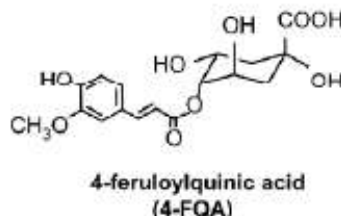
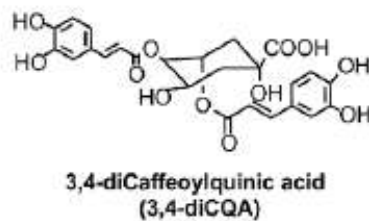
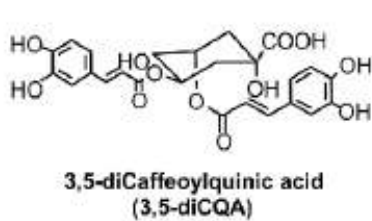
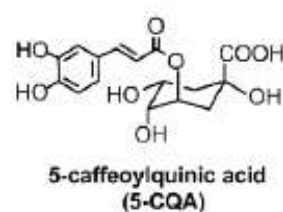
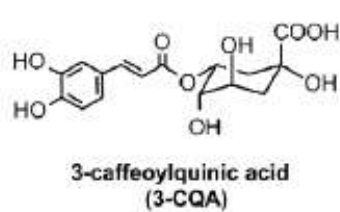
## 1.7 Καφές

Ο καφές είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως καθώς καταναλώνονται περίπου οκτώ τόνοι ετησίως και προέρχεται από τους σπόρους του φυτού *Coffea sp.* μετά από τη διαδικασία του καβουρδίσματος που υφίστανται. Αυτή η διαδικασία μεταβάλλει τα συστατικά του κι έτσι ο πράσινος καφές, δηλαδή αυτός που δεν έχει υποστεί

καβούρδιμα, διαφέρει στη σύστασή του από τον καβουρδισμένο λόγω των αντιδράσεων Maillard που πραγματοποιούνται.

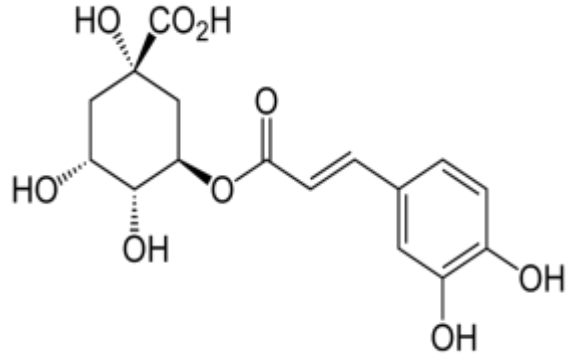
Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του καφέ έχουν δείξει ότι περιέχει τουλάχιστον χίλιες ενώσεις με ποικιλία δράσεων, εκ των οποίων διάφορα οργανικά οξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και καφεΐνη.

Από τα οργανικά οξέα που περιέχονται στον καφέ, αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι τα χλωρογενικά οξέα, των οποίων η συγκέντρωση είναι πέντε με επτά φορές μεγαλύτερη από αυτή της καφεΐνης. Είναι φαινολικές ενώσεις που προσδίδουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες στον καφέ και των οποίων η δομή φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 12 :** Δομές χλωρογενικών οξέων

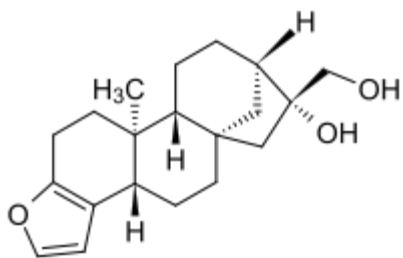
Η πιο άφθονη αυτών είναι το 3-CQA το οποίο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



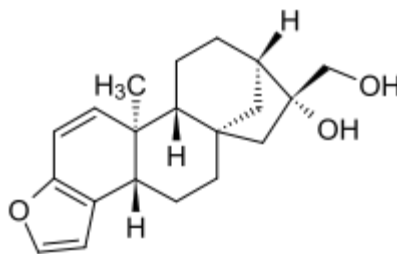
**Εικόνα 13:** Δομή 3-CQA

Τα χλωρογενικά οξέα έχει βρεθεί ότι έχουν πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη δράση, ελαττώνουν την πιθανότητα εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων και έχει βρεθεί επίσης ότι ρυθμίζουν το μεταβολισμό γλυκόζης και λιπών *in vivo* τόσο σε υγιείς όσο και σε πάσχοντες από μεταβολικό σύνδρομο που οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες (Liang & Kitts 2015; Meng et al. 2013). Επίσης, έχει βρεθεί 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 et al. 2012; Moreira et al. 2012) και υπάρχουν μόρια που παραμένουν ελεύθερα.

Στον καφέ περιέχονται επίσης και τα διτερπένια καφεόλη και καφεστόλη τα οποία μοιάζουν δομικά όπως φαίνεται στις εικόνες παρακάτω:



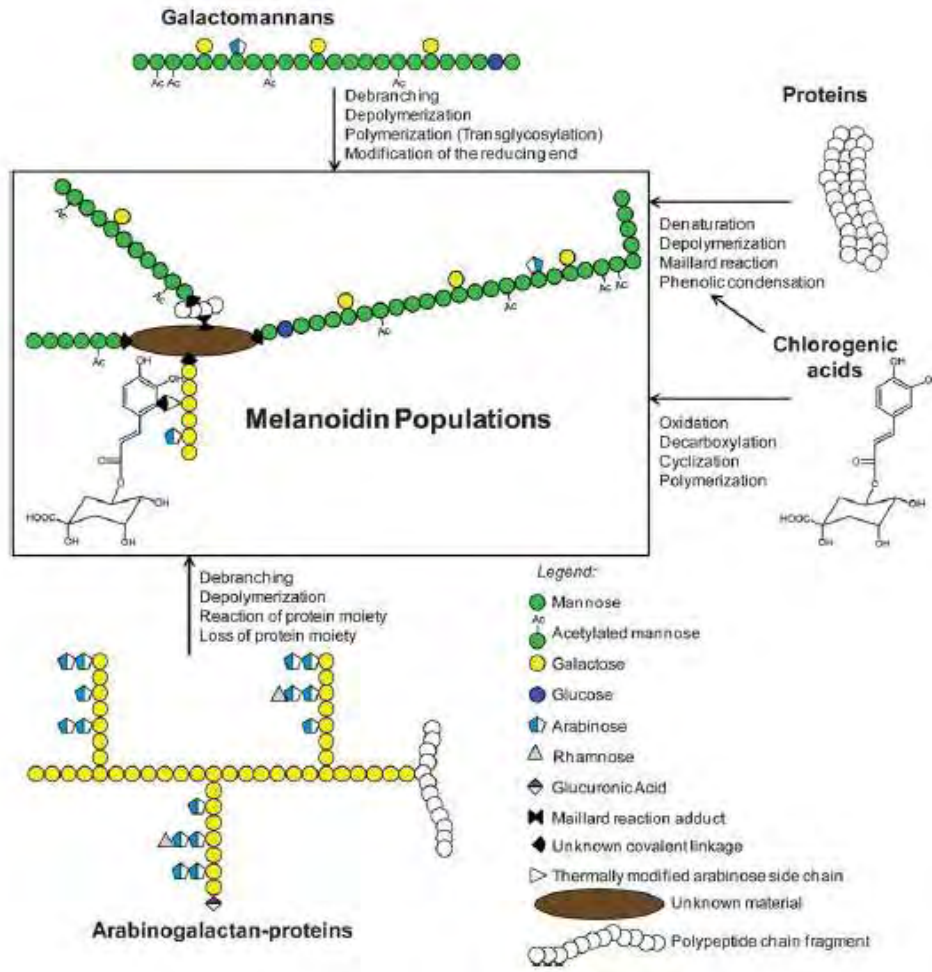
**Εικόνα 14 :** Δομή καφεστόλης



**Εικόνα 15:** Δομή καφεόλης

Οι δύο αυτές ουσίες υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε καφέδες οι οποίοι δεν υπόκεινται φιλτράρισμα κατά τη διαδικασία κατανάλωσή τους και επίσης έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωσή τους δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία καβουρδίσματος. Οι δράσεις τους μελετώνται και έχει βρεθεί ότι έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες (Cavin et al. 2002).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος, πραγματοποιούνται αντιδράσεις Maillard, δηλαδή αντιδράσεις μεταξύ αμινοξέων και αναγόντων σακχάρων. Μέσω αυτών των αντιδράσεων σχηματίζονται μεγάλοι μοριακού βάρους ουσίες που ονομάζονται μελανοΐδινες και προσδίδουν καφέ χρώμα στους κόκκους. 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 16:** Δομή σκελετού μελανοϊδινών που έχει προταθεί

Έχει βρεθεί σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί in vitro ότι οι μελανοϊδίνες διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία όπως έχει προταθεί οφείλεται σε χαμηλού μοριακού βάρους μόρια που είναι συνδεδεμένα μη ομοιοπολικά στο σκελετό, όπως χλωρογενικά οξέα (Perrone et al. 2012)(Moreira et al. 2012)

## 2. Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η ανάλυση της επίδρασης εκχυλισμάτων καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών

κυττάρων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ψημένοι και άψητοι κόκκοι από τα δυο είδη καφέ (*Coffea arabica* & *Coffea canephora*) όσο και διαφορετικοί χρόνοι καβουρδίσματος.

### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Αντιδραστήρια

Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (Grand Island, NY). Οι χρωστικές mercury orange και 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού (2,7-dichlorofluorescein diacetate ,DCF-DA) αποκτήθηκαν Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Το kit κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ΧΤΤ) αγοράστηκε από την εταιρία Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

#### 3.2 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ

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 (12.30min, 218°C)

Και τα δυο Ντεκαφεϊνέ:

- 8) Espresso Swiss Water Decaf Green
- 9) Espresso Swiss Water Decaf Roasted (12min, 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 eppendorf (aliquots των 200μl) και αυτά φυλάσσονται στους -80°C.

### 3.3 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926

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

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

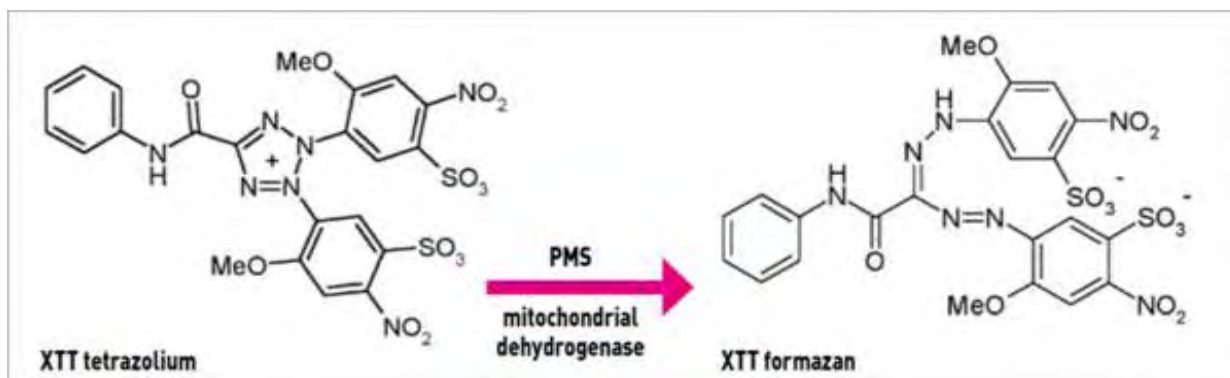


αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

### 3.4 Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλισμάτων καφέ

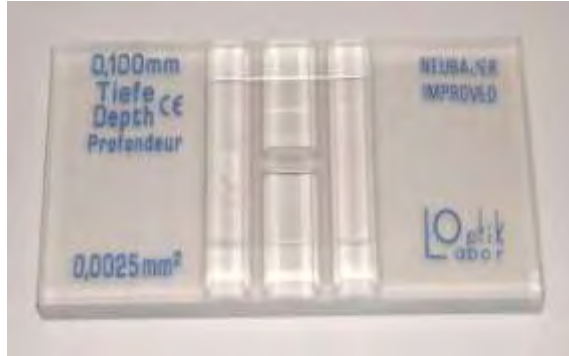
Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων καφέ, τόσο στα C2C12 όσο και στα EA.hy926 κύτταρα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit ΧΤΤ assay της εταιρείας Roche.

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



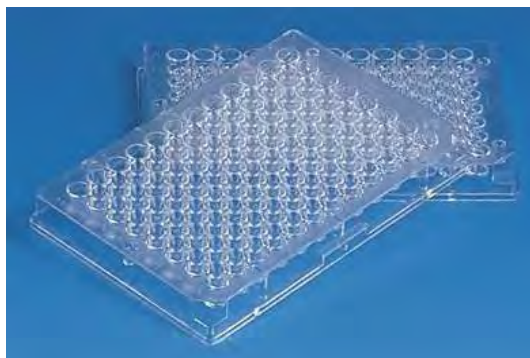
**Εικόνα 17:** Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml.



**Εικόνα 18:** Πλάκα Neubauer

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση  $10^4$  κυττάρων/θέση σε ένα 96-well plate. Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 h στους  $37^{\circ}\text{C}$  και σε 5%  $\text{CO}_2$  προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος καφέ σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100 μl. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια των οποίων τα κύτταρα σε καθένα από αυτά έχει προέλθει από διαφορετική φλάσκα. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση αλλά και για το control χρησιμοποιείται τέταρτο πηγαδάκι που δε περιέχει κύτταρα για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του θρεπτικού και του εκχυλίσματος. Το πείραμα πραγματοποιείται εις τριπλούν. Έπειτα, το plate επώάζεται για 24 h στους  $37^{\circ}\text{C}$  και σε 5%  $\text{CO}_2$ .



**Εικόνα 19:** 96-well plate

Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα ΧΤΤ σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. Το μείγμα του ΧΤΤ προκύπτει από την ανάμιξη ΧΤΤ Α και ΧΤΤ Β (PMS), πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται αμέσως πριν την χρησιμοποίησή του. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm καθώς και στα 630nm (για καλιμπράρισμα) με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή των εκχυλισμάτων καφέ στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy 926 υπολογίζεται από τον τύπο:

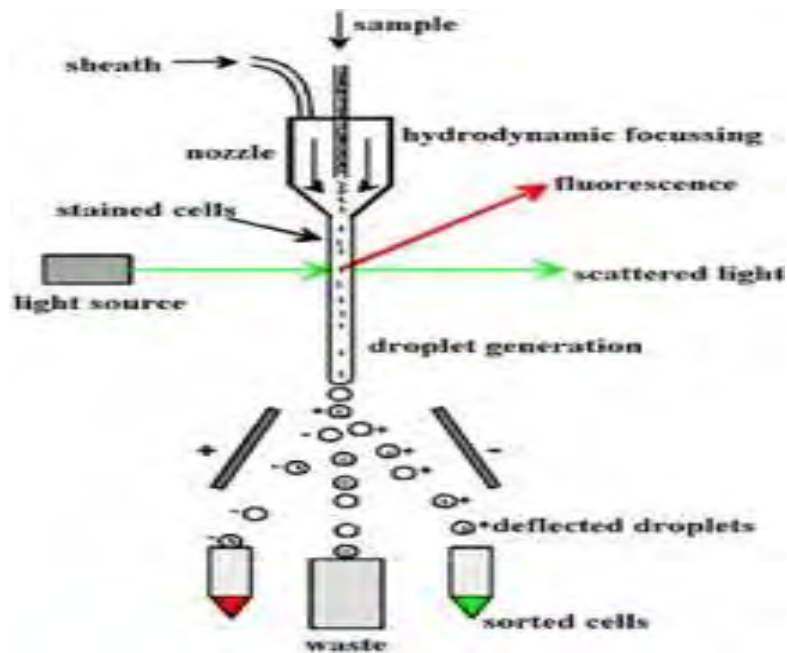
$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

Για να θεωρηθεί μία συγκέντρωση εκχυλίσματος καφέ κυτταροτοξική, η βιωσιμότητα των κυττάρων θα πρέπει να είναι κάτω από 80% και αυτές οι συγκεντρώσεις δε χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής.

### 3.5 Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της

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



**Εικόνα 20 :** Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με μία ή περισσότερες ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά

εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο).

Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδέεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδέεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάζεται ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύεται στους 4°C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα.

Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργούνται σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει το εκχύλισμα καφέ σε τέσσερις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις οι οποίες έχει προκύψει από τη μέθοδο ΧΤΤ ότι δεν είναι κυτταροτοξικές. Χρησιμοποιούνται και

δύο φλάσκες control οι οποίες περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Έπειτα ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (333 μl 0,25% για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, μεταφορά κάθε φλάσκας σε falcon και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με 2ml PBS (0,01 M με pH 7,4), έπειτα φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά, αφαίρεση υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση σε 300μl PBS (0,01 M με pH 7,4).

Στη συνέχεια κάθε δείγμα 300μl χωρίζεται σε δύο σωληνάκια κυτταρομέτρου από 150μl στο καθένα και στη συνέχεια προστίθενται 15μl χρωστικής ουσίας σε κάθε σωληνάκι. Προστίθεται mercury orange στα σωληνάκια που θα μετρηθεί η GSH και DCF-DA σε αυτά που θα μετρηθούν τα ROS. Τα δείγματα επώάζονται στους 37°C στο σκοτάδι και μετά το πέρας 30 λεπτών προστίθεται σε αυτά 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα που έχουν καθιζάνει επαναδιαλυτοποιούνται σε 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί η μέτρησή τους με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρούνται η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύονται με έναν ρυθμό 1000 γεγονότων/sec. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετράται σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύονται χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

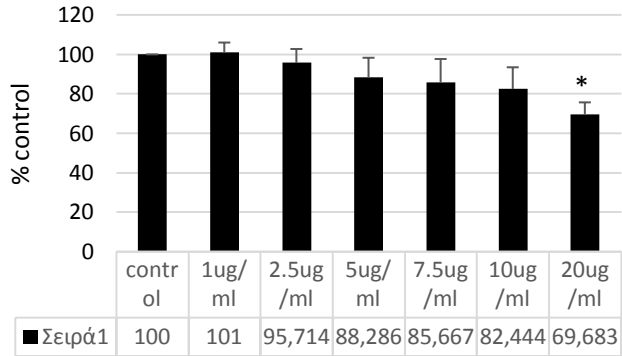
## 4 Αποτελέσματα

### 4.1 ΧΤΤ

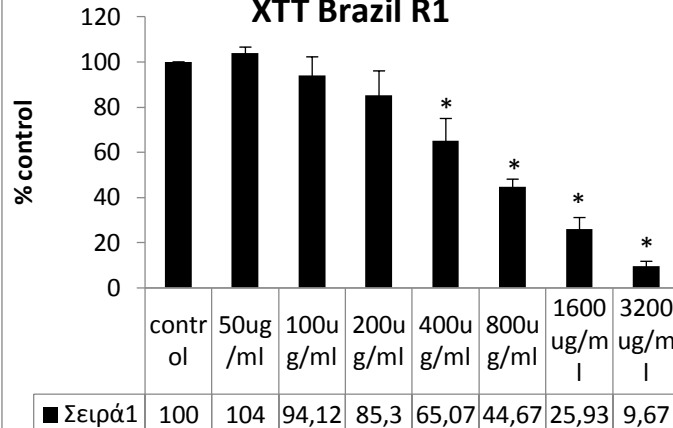
Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:

Αποτελέσματα ΧΤΤ στα C2C12:

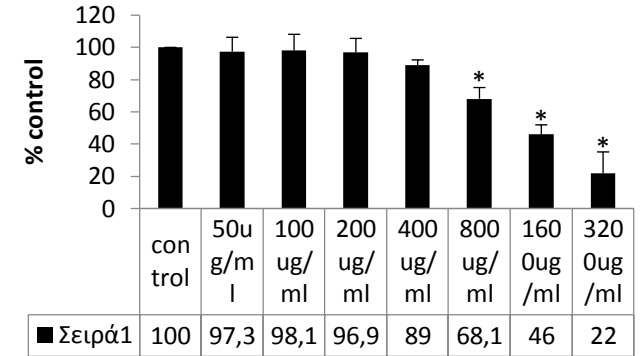
**XTT Brazil Green**



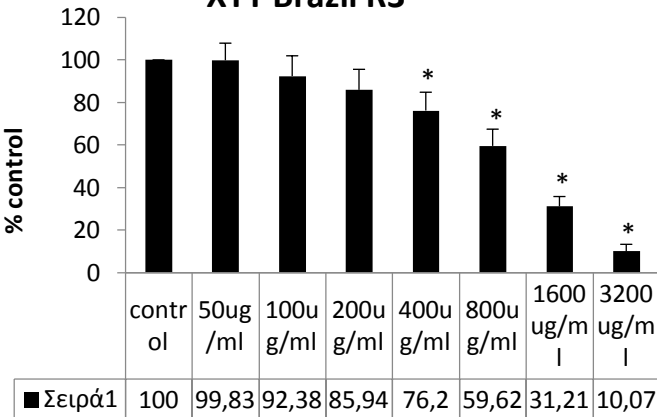
**XTT Brazil R1**



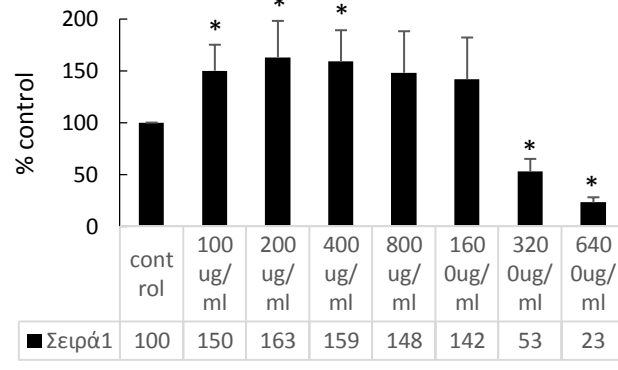
**XTT Brazil R2**



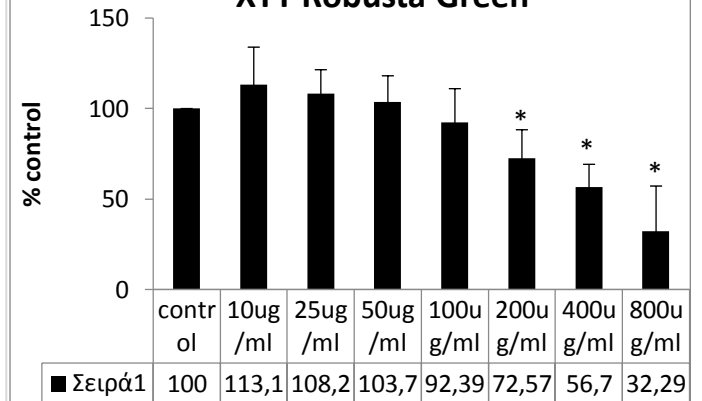
**XTT Brazil R3**



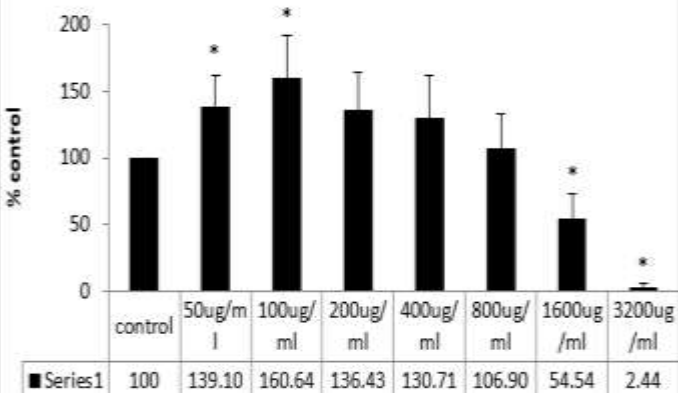
**XTT Brazil R4**



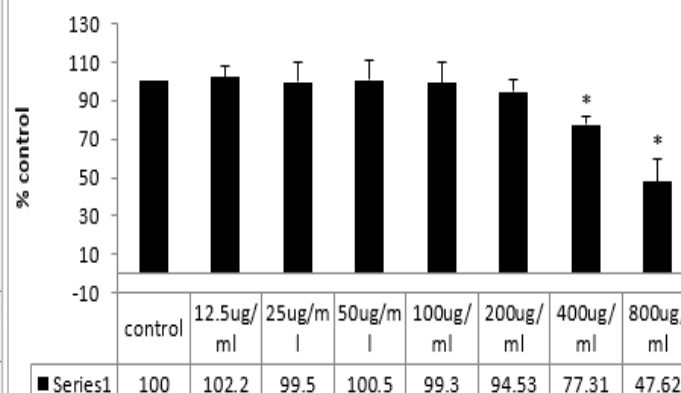
**XTT Robusta Green**



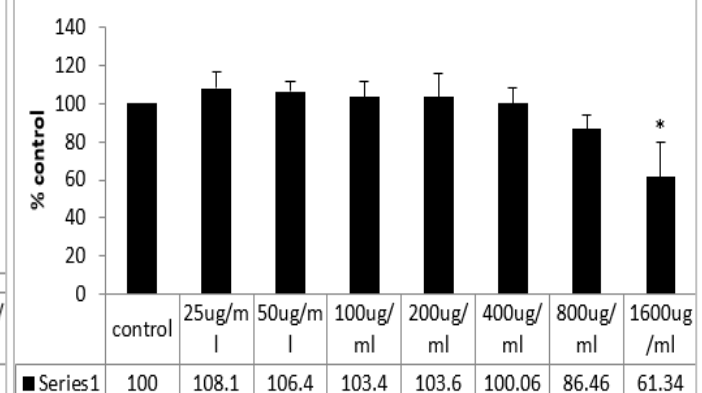
**XTT Robusta Roasted**



**XTT Espresso SW Green**



**XTT Espresso SW Roasted**





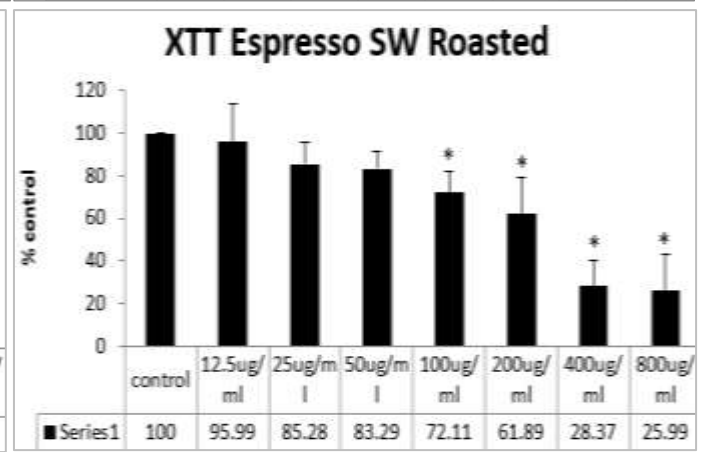
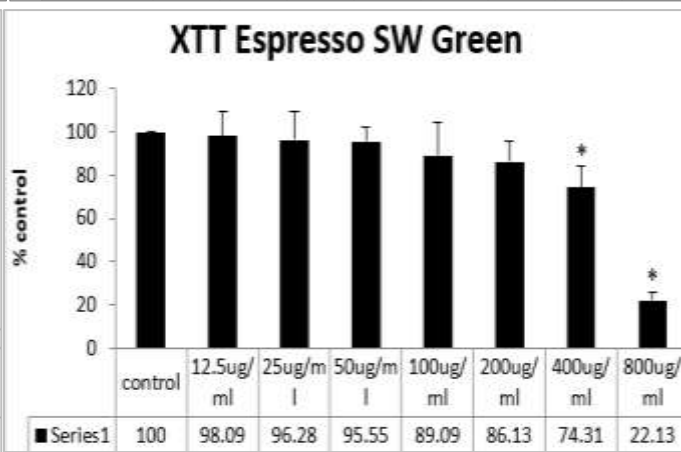
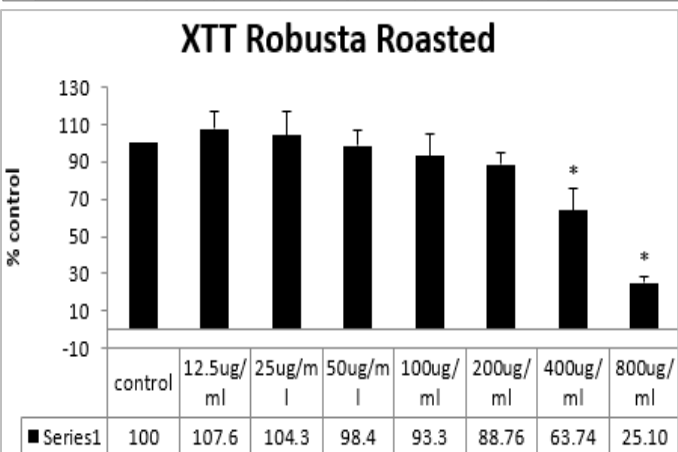
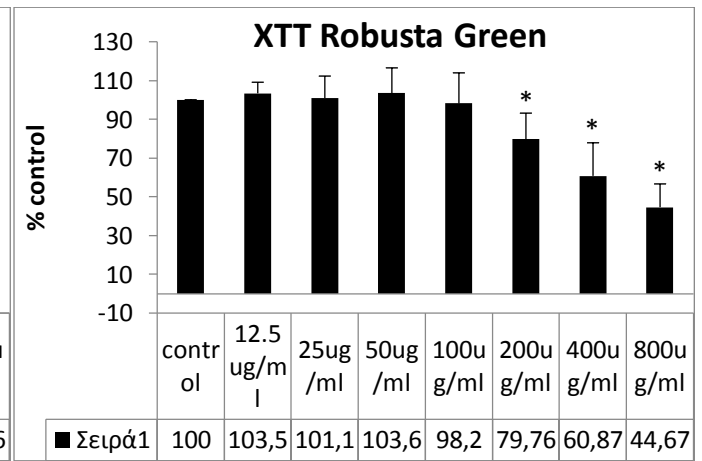
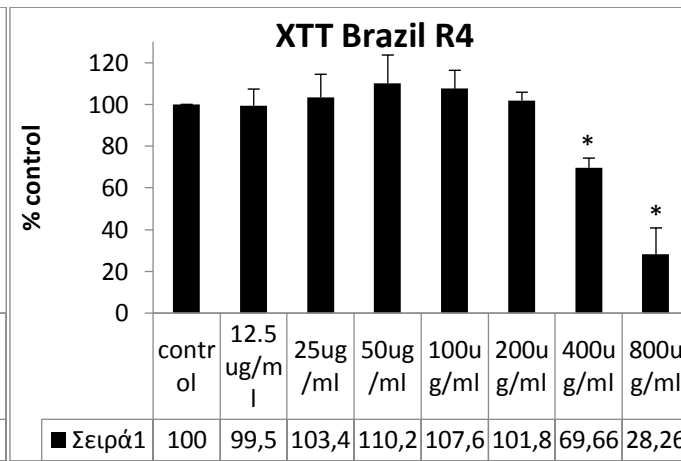
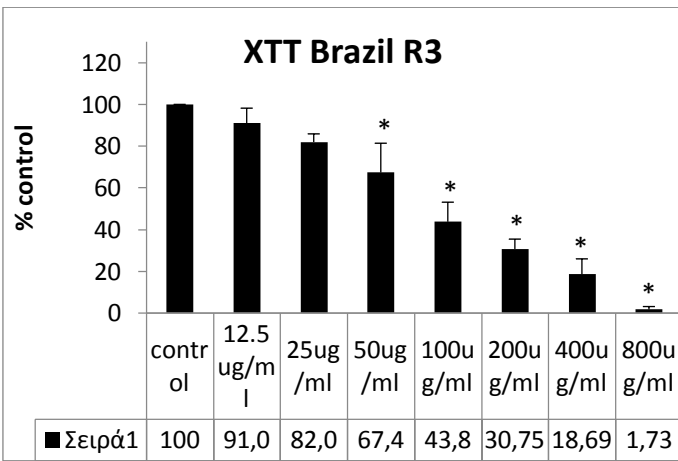
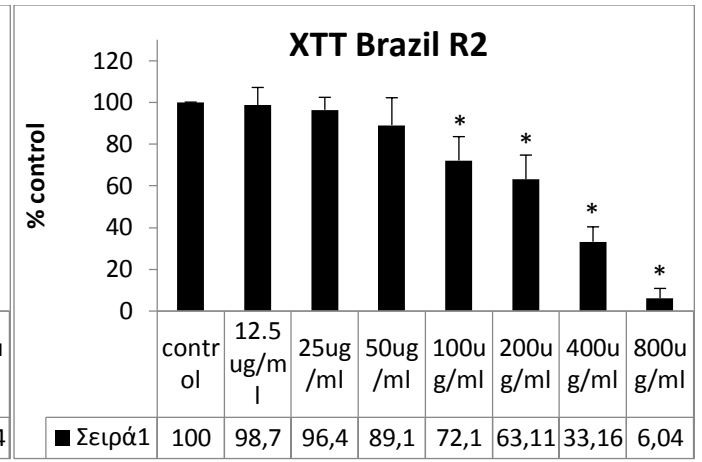
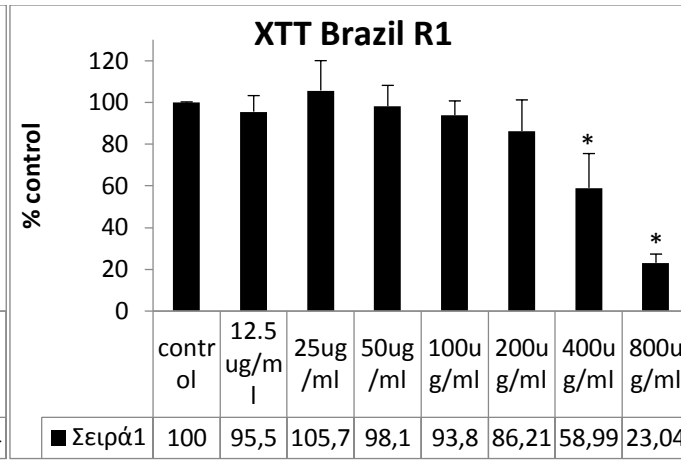
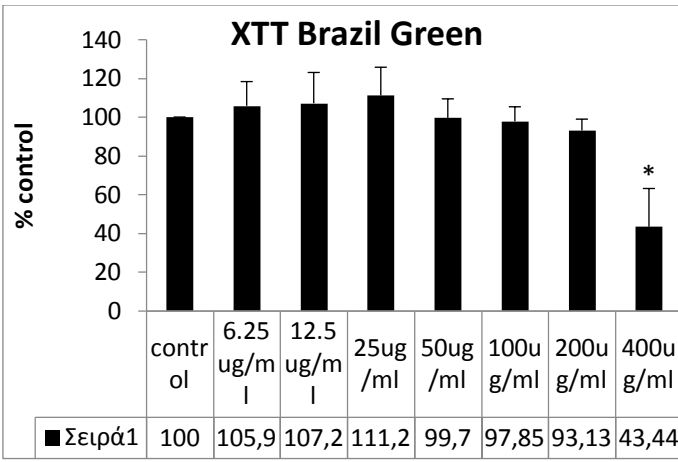
**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα ΧΤΤ σε C2C12

<b>Καφές</b>	<b>Κυτταροτοξικότητα στα (µg/ml):</b>
Brazil Green	20
Brazil R1	400
Brazil R2	800
Brazil R3	400
Brazil R4	3200
Robusta Green	200
Robusta Roasted	1600
Espresso SWD Green	400
Espresso SWD Roasted	1600

Από τα αποτελέσματα στον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις ο πράσινος καφές είναι κυτταροτοξικός σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι ο καβουρδισμένος. Στον Brazil Green παρατηρείται η μικρότερη συγκέντρωση εμφάνισης κυτταροτοξικότητας και όσον αφορά τους διαφορετικούς χρόνους καβουρδίσματος του Brazil, ο πιο ελαφρά καβουρδισμένος (Brazil R4) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισης κυτταροτοξικότητας. Ο Robusta Green και ο Espresso SWD Green εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους Roasted, που είναι 100 και 200 φορές μεγαλύτερη αντίστοιχα από την συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα στον Brazil Green.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στα Brazil R4 και Robusta Roasted παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 100-400µg/ml και 50-100µg/ml αντίστοιχα.

Αποτελέσματα ΧΤΤ στα ΕΑ.hy926:



**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα ΧΤΤ σε EA.hy926

<b>Καφές</b>	<b>Κυτταροτοξικότητα στα (µg/ml):</b>
Brazil Green	400
Brazil R1	400
Brazil R2	100
Brazil R3	50
Brazil R4	400
Robusta Green	200
Robusta Roasted	400
Espresso SWD Green	400
Espresso SWD Roasted	100

Στην περίπτωση των κυττάρων EA.hy926 δε παρατηρείται όπως στα C2C12 ο πράσινος καφές να είναι κυτταροτοξικός σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τον καβουρδισμένο καθώς αυτό ισχύει μόνο στην περίπτωση του Robusta. Όσον αφορά τον Brazil, ο Brazil Green, ο Brazil με το πιο έντονο καβούρδισμα (Brazil R1) και ο Brazil με το πιο ελαφρύ καβούρδισμα (Brazil R4) εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα στην ίδια συγκέντρωση. Ο Brazil R3 ήταν αυτός που εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στη μικρότερη συγκέντρωση μεταξύ των Brazil αλλά και των υπόλοιπων δειγμάτων. Ο Espresso SWD Green εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε 4 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τον Roasted.

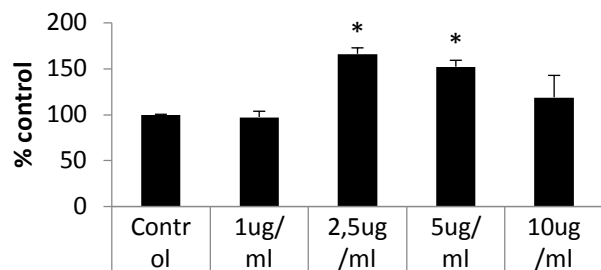
Επίσης, στα κύτταρα EA.hy926 δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση βιωσιμότητας όπως στα C2C12.

## 4.2 Κυτταρομετρία ροής

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:

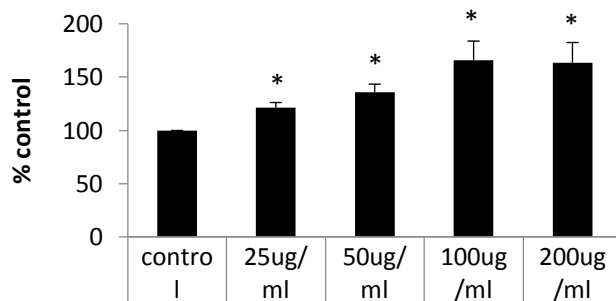
GSH levels στα C2C12:

GSH levels Brazil Green



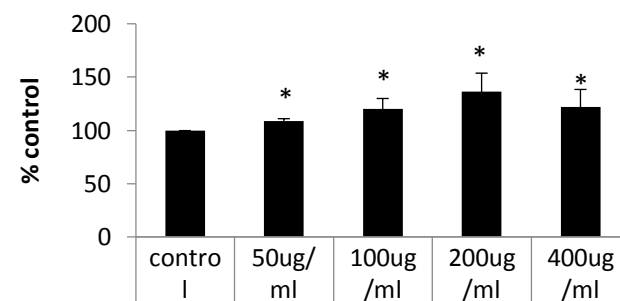
Br excl Green	100	97,0892	165,905	151,871	118,492
---------------	-----	---------	---------	---------	---------

GSH levels Brazil R1



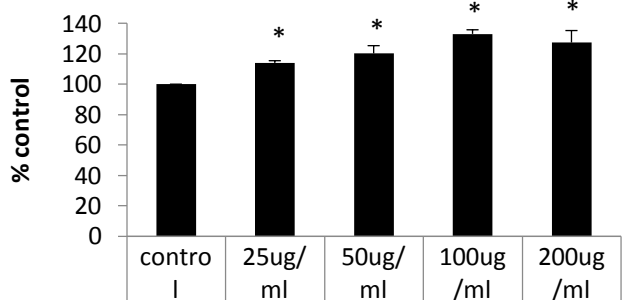
■ Σειρά1	100	121,284	136,103	165,934	163,621
----------	-----	---------	---------	---------	---------

GSH levels Brazil R2



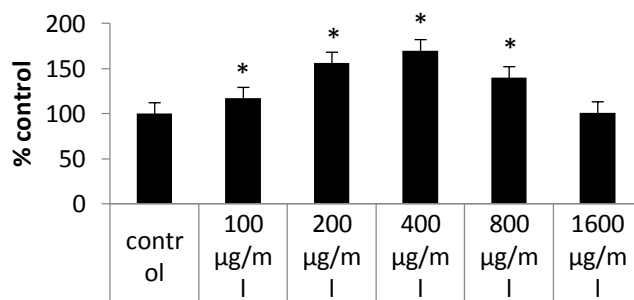
■ Σειρά1	100	108,856	120,098	136,185	121,759
----------	-----	---------	---------	---------	---------

GSH levels Brazil R3



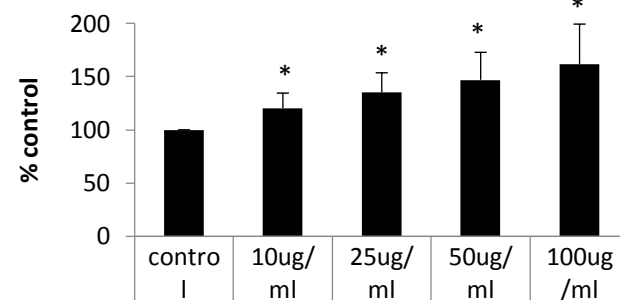
■ Σειρά1	100	113,964	120,223	133,067	127,365
----------	-----	---------	---------	---------	---------

GSH levels Brazil R4



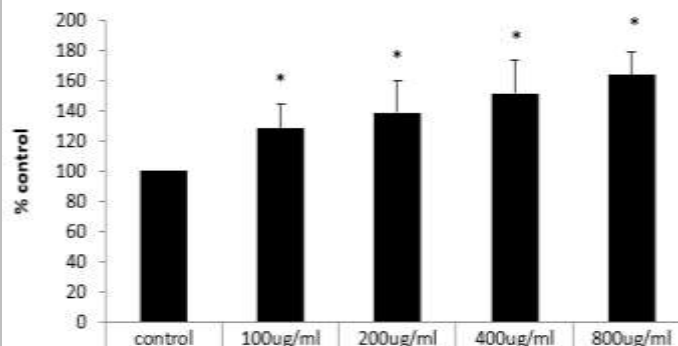
■ Σειρά1	100	117	156	170	140	101
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

GSH levels Robusta Green



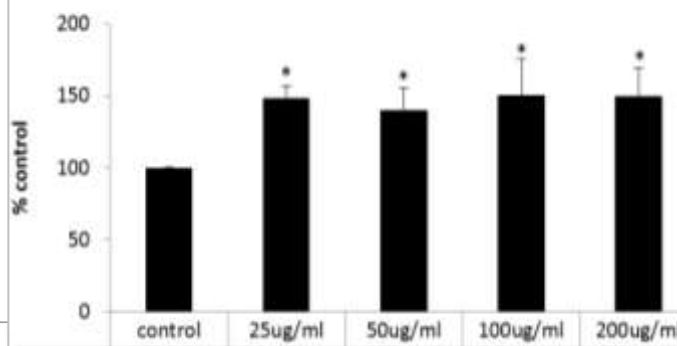
■ Σειρά1	100	120,371	135,098	146,96	161,896
----------	-----	---------	---------	--------	---------

GSH levels, Robusta Roasted



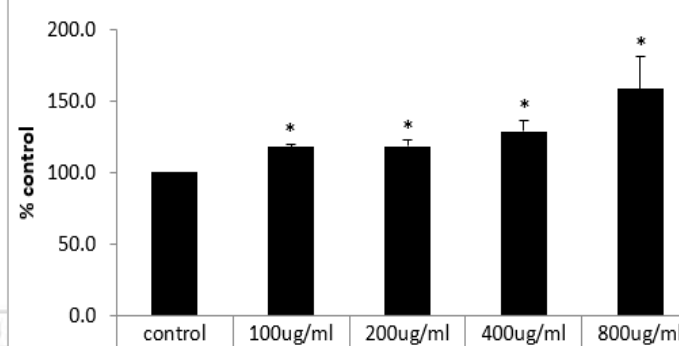
■ Series1	100	128.27	138.72	151.18	163.46
-----------	-----	--------	--------	--------	--------

GSH levels, Espresso SW Green



■ Series1	100	148.4	140.1	150.2	149.55
-----------	-----	-------	-------	-------	--------

GSH levels, Espresso SW Roasted



■ Series1	100.0	117.9	118.3	128.8	158.45
-----------	-------	-------	-------	-------	--------



## Επίπεδα GSH:

Όλα τα υπό εξέταση δείγματα αύξησαν σημαντικά τη γλουταθειόνη, με τις μεγαλύτερες αυξήσεις ανά δείγμα να είναι από 33% έως 70%. Αναλυτικότερα, ο παρακάτω πίνακας δείχνει τη μεγαλύτερη αύξηση ανά δείγμα και τη συγκέντρωση στην οποία αυτή επετεύχθη:

**Πίνακας 5:** Επίπεδα GSH σε C2C12

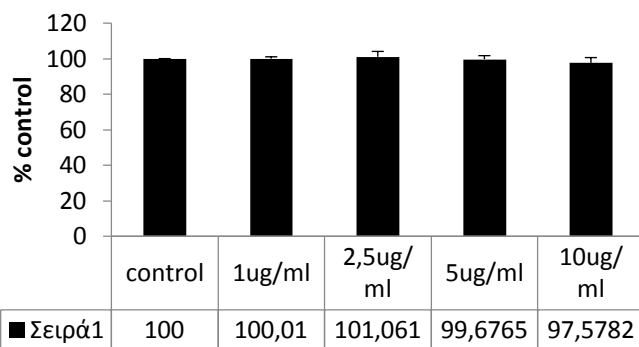
Δείγμα	Αύξηση (%)	Συγκέντρωση
Brazil Green	65.9	2.5 µg/ml
Brazil R1	65.9	100 µg/ml
Brazil R2	36.2	200 µg/ml
Brazil R3	33	100 µg/ml
Brazil R4	70	400 µg/ml
Robusta Green	61.9	100 µg/ml
Robusta Roasted	63.5	800 µg/ml
Espresso SWD Green	50.2	100µg/ml
Espresso SWD Roasted	58.45	800µg/ml

Σε σχέση με τη συγκέντρωση, ο πιο δραστικός καφές φάνηκε να είναι ο Brazil Green, που αύξησε τη γλουταθειόνη κατά 65.9% στα 2.5 µg/ml, 40 με 320 φορές μικρότερη από τις συγκεντρώσεις με τη μέγιστη αύξηση στα υπόλοιπα δείγματα. Είναι αξιοσημείωτο πως τα 5 από τα 7 δείγματα προκάλεσαν αύξηση της γλουταθειόνης από 61.9% έως 70% με μόνο δύο εξαιρέσεις (R2 & R3) που προκάλεσαν μικρότερη αύξηση, της τάξης του 36.2 και 33% αντίστοιχα.

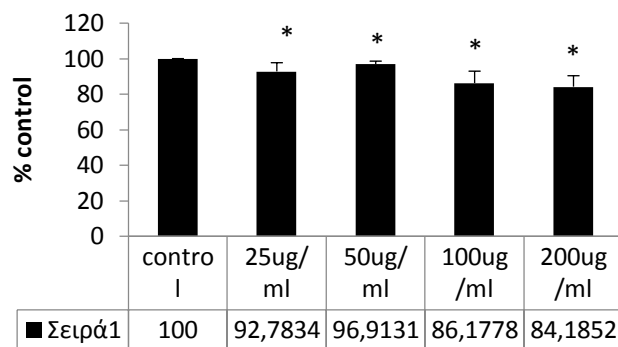
Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι πως και στα 5 δείγματα Brazil παρουσιάστηκε μια μέγιστη τιμή στα επίπεδα γλουταθειόνης η οποία εν συνεχεία μειώθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, έστω και οριακά (πχ Brazil R1). Αντίθετα, στον Robusta, η αύξηση ήταν δοσο-εξαρτώμενη. Στον Espresso SWD, στο άψητο δείγμα παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση σε όλες τις συγκεντρώσεις ενώ στον ψημένο η αύξηση ήταν δοσο-εξαρτώμενη.

ROS levels στα C2C12:

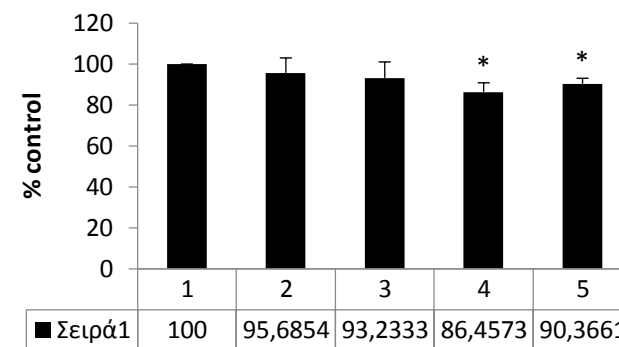
ROS levels, Brazil Green



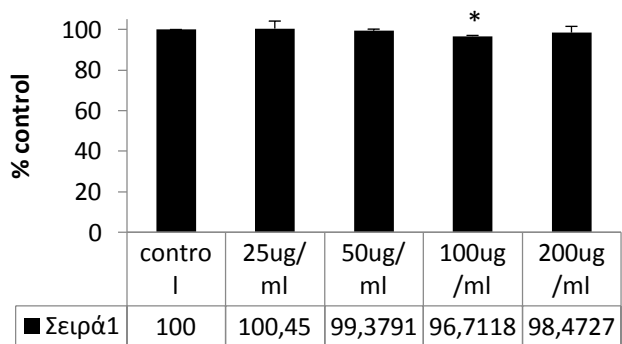
ROS levels Brazil R1



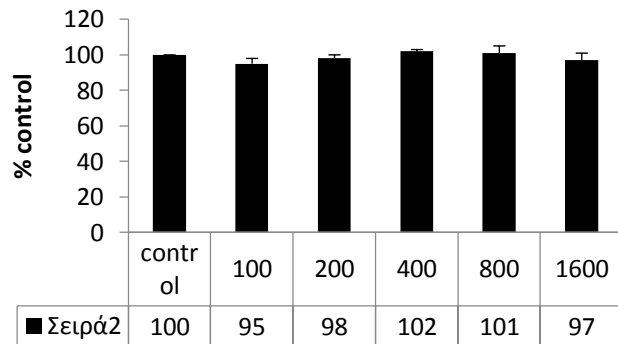
ROS levels Brazil R2



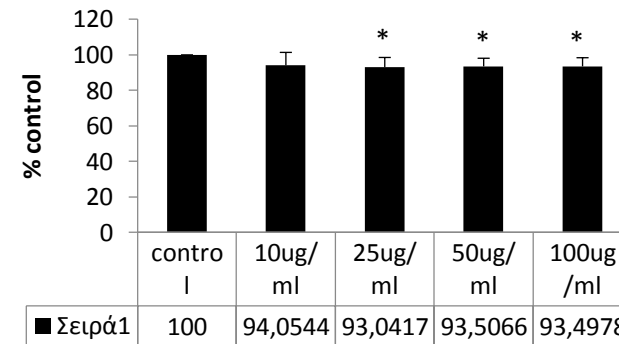
ROS levels Brazil R3



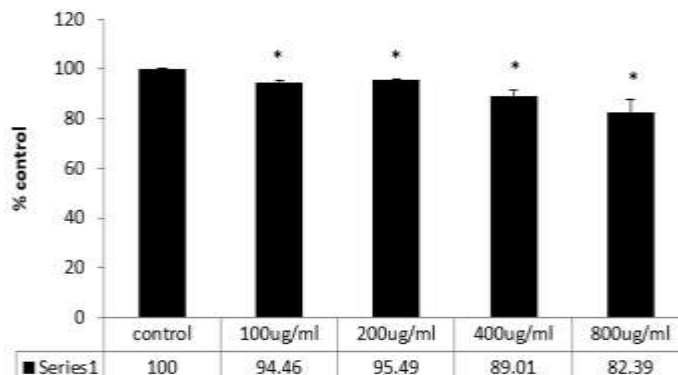
ROS levels Brazil R4



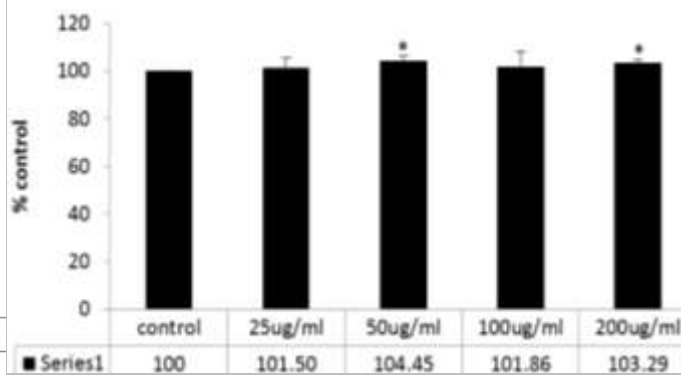
ROS levels Robusta Green



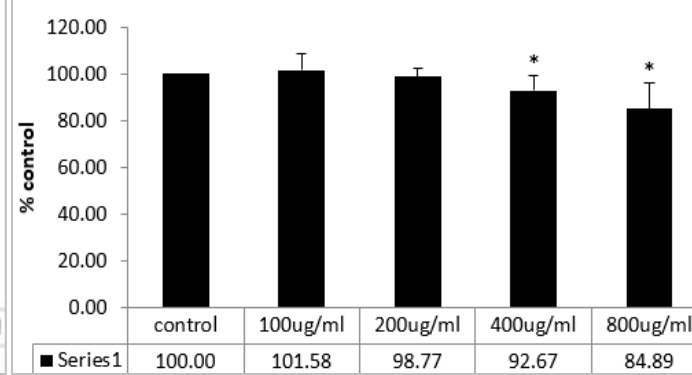
ROS levels, Robusta Roasted



ROS levels, Espresso SW Green



ROS levels, Espresso SW Roasted



## Επίπεδα ROS:

Οι περισσότεροι καφέδες προκάλεσαν μια μείωση στα επίπεδα των ROS, από 3.3% έως 17.7%. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τη μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε ανά δείγμα καθώς και τη συγκέντρωση στην οποία αυτή παρατηρήθηκε:

**Πίνακας 6:** Επίπεδα ROS σε C2C12

<b>Δείγμα</b>	<b>Μείωση (%)</b>	<b>Συγκέντρωση</b>
Brazil Green	-	-
Brazil R1	15.9	200 µg/ml
Brazil R2	13.6	200 µg/ml
Brazil R3	3.3	100 µg/ml
Brazil R4	-	-
Robusta Green	7	25 µg/ml
Robusta Roasted	17.7	800 µg/ml
Espresso SWD Green	- (+4.45)	50µg/ml
Espresso SWD Roasted	15.11	800µg/ml

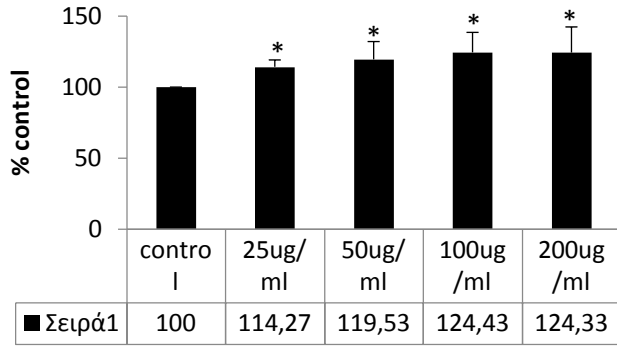
Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί είναι πως υπάρχει μια αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS με το ψήσιμο. Οι πράσινοι καφέδες είχαν καθόλου (Brazil) ή μικρή (7%) ικανότητα μείωση των ROS ενώ αξιοσημείωτος είναι ο Espresso SWD όπου παρατηρήθηκε αύξηση των ROS. Στο Robusta Roasted φαίνεται η μεγαλύτερη μείωση (17.7%). Στο Brazil, μπορούμε να δούμε πως όσο αυξάνει ο χρόνος ψησίματος (από το R4 στο R1) τόσο μειώνονται και τα ROS, κι έτσι από μηδενική μείωση των ROS φτάνει το 15.9%.

Στα ROS η μείωση, όπου υπήρχε, ήταν δοσο-εξαρτώμενη. Στο Robusta είναι ενδιαφέρον πως η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε σε 32 φορές μικρότερη συγκέντρωση (25µg/ml) σε σχέση με τον αντίστοιχο ψημένο (800µg/ml).

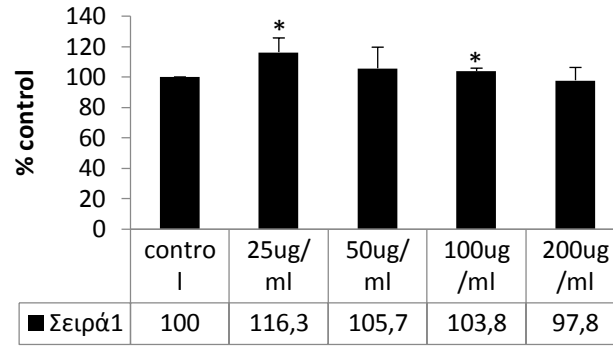


GSH levels στα EA.hy926:

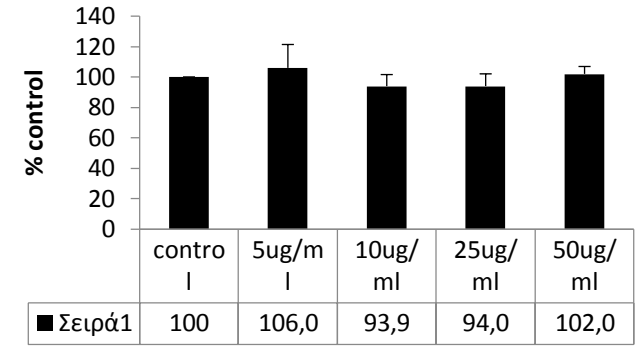
GSH levels, Brazil Green



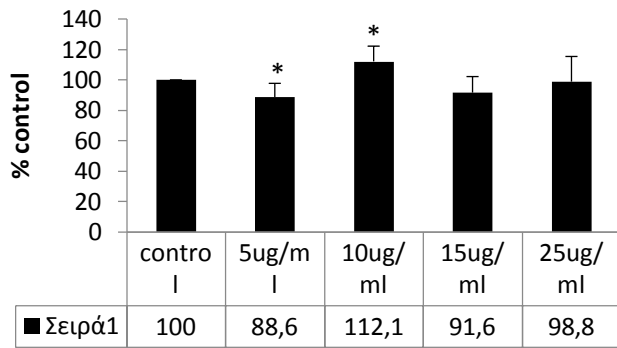
GSH levels, Brazil R1



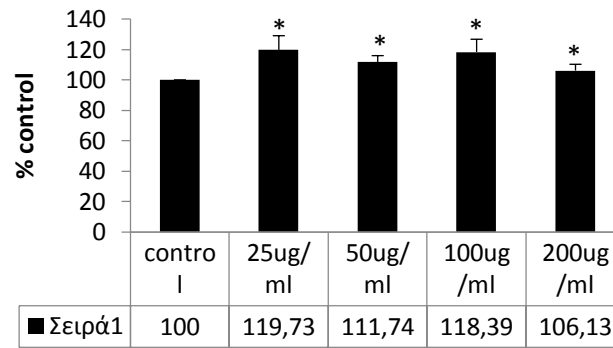
GSH levels, Brazil R2



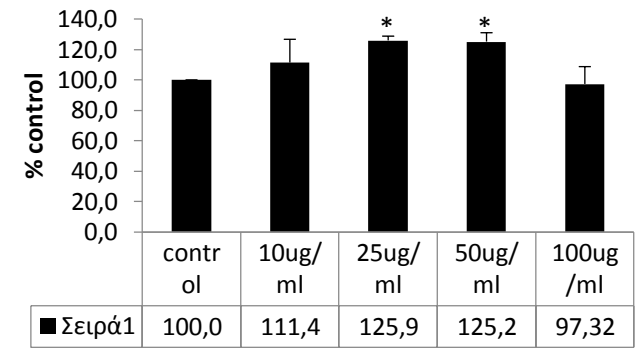
GSH levels, Brazil R3



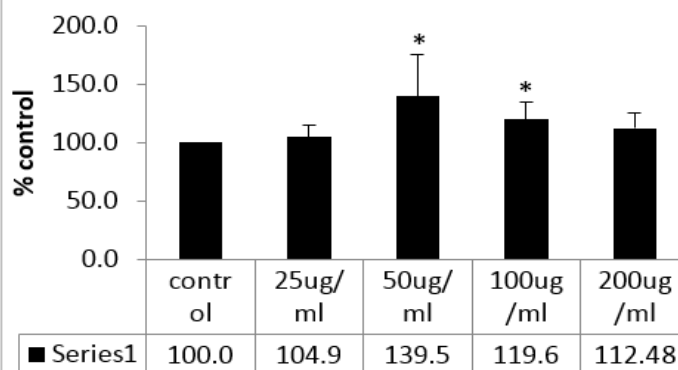
GSH levels, Brazil R4



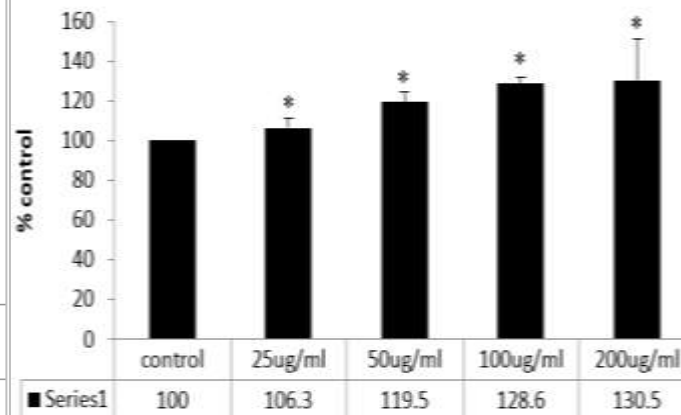
GSH levels, Robusta Green



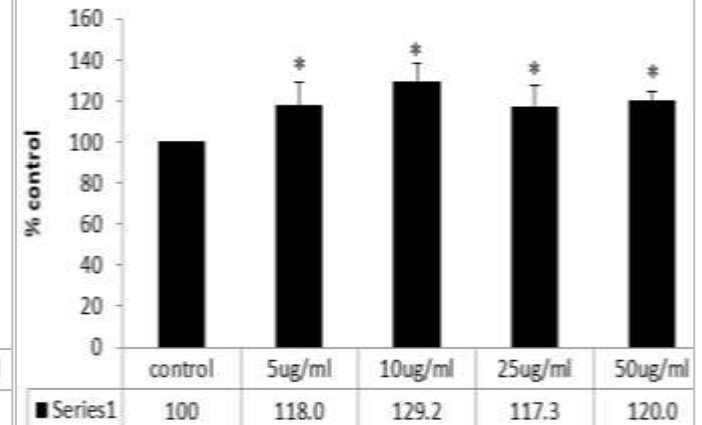
GSH levels, Robusta Roasted



GSH levels, Espresso SWD Green



GSH levels, Espresso SWD Roasted



## Επίπεδα GSH:

Τα περισσότερα υπό εξέταση δείγματα αύξησαν σημαντικά τη γλουταθειόνη, με τις μεγαλύτερες αυξήσεις ανά δείγμα να είναι από 12.1% έως 39.5%. Αναλυτικότερα, ο παρακάτω πίνακας δείχνει τη μεγαλύτερη αύξηση ανά δείγμα και τη συγκέντρωση στην οποία αυτή επετεύχθη:

**Πίνακας 7:** Επίπεδα GSH σε EA.hy926

Δείγμα	Αύξηση (%)	Συγκέντρωση
Brazil Green	24.4	100 µg/ml
Brazil R1	16.3	25 µg/ml
Brazil R2	-	-
Brazil R3	12.1	10 µg/ml
Brazil R4	19.7	25 µg/ml
Robusta Green	25.9	25 µg/ml
Robusta Roasted	39.5	50 µg/ml
Espresso SWD Green	30.5	200µg/ml
Espresso SWD Roasted	29.2	10µg/ml

Σε σχέση με τη συγκέντρωση, δεν υπήρχε τόσο μεγάλη διαφορά όπως στα C2C12. Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι υπάρχει αντιστροφή στη δραστικότητα καθώς ο Brazil Green εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της αύξησης του σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι οι αντίστοιχοι ψημένοι. Στους Brazil, τη μεγαλύτερη αύξηση κατέγραψε ο Green κατά 24.4% στα 100µg/ml ενώ αμέσως μετά είναι οι R4, 1, 3, και 2 κατά 19.7%, 16.3%, 12.1% και 0 (ο R2 δεν εμφάνισε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στη γλουταθειόνη).

Η μέγιστη τιμή και η μετέπειτα πτώση αυτή τη φορά παρατηρήθηκαν στους δυο Robusta, ενώ στους Brazil σε κάποιους ήταν δοσο-εξαρτώμενο (Green) και σε κάποιους παρατηρήθηκε μέγιστη τιμή (R1, R3 & R4).

Στον Espresso SWD, στο άψητο δείγμα παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση.

Σε αντίθεση με τους μυοβλάστες, το ψήσιμο φάνηκε να αυξάνει τη δραστικότητα στα Brazil, καθώς χρειάστηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί σημαντική αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης (με εξαίρεση το R2). Ωστόσο, η αύξηση δεν έφτασε σε καμία περίπτωση τα επίπεδα που φτάνει στον Green. Παρόλα αυτά, είχαμε και εδώ μια ομοιότητα

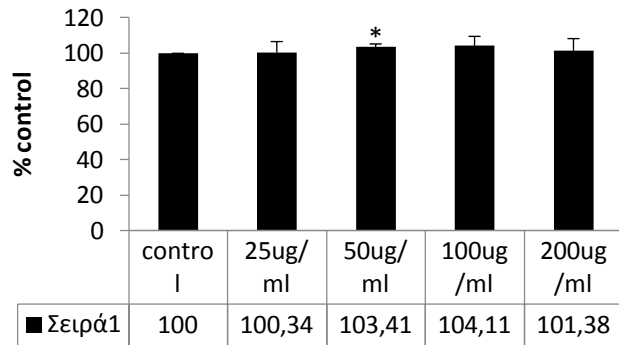
με τους μυοβλάστες, καθώς τα R1 και R4 είχαν μεγαλύτερο αποτέλεσμα σε σχέση με τα R2 & R3. Αύξηση δραστηριότητας παρατηρήθηκε και στον Robusta καθώς ο ψημένος εμφάνισε μεγαλύτερη αύξηση (39.5% -25.9%) σε σχέση με τον άψητο.

Όσον αφορά τον Decaf, το άψητο δείγμα οδήγησε σε αύξηση έως και κατά 30.5% ενώ το ψημένο δείγμα οδήγησε σε αύξηση έως 39.3% (σε 4 φορές μικρότερη συγκέντρωση, 50 έναντι 200μg/ml), γεγονός που υποδηλώνει πως και εδώ η απουσία καφεΐνης δεν επηρέασε ιδιαίτερα την ικανότητα του καφέ να αυξάνει τη γλουταθειόνη.

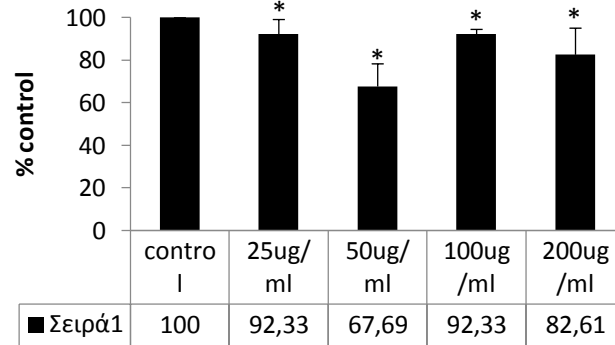
Τέλος, στην χαμηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε στον R3 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων GSH (-11.4%).

ROS levels στα EA.hy926:

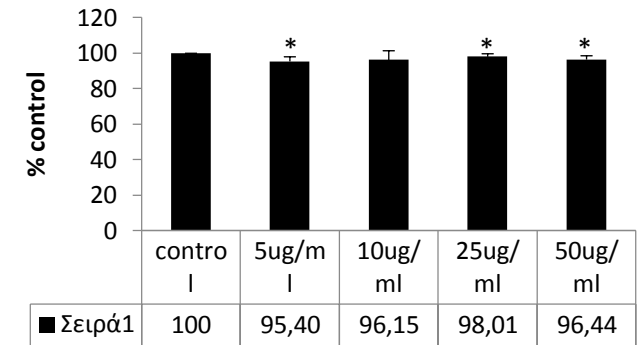
ROS levels, Brazil Green



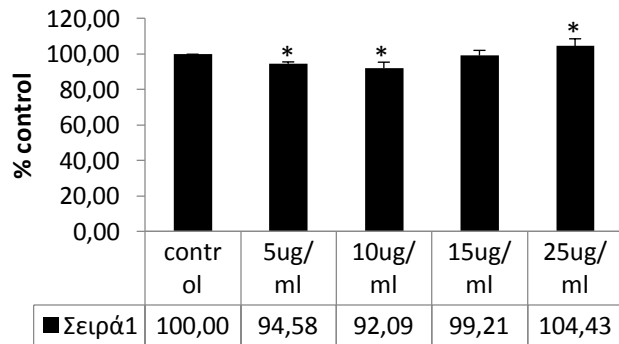
ROS levels, Brazil R1



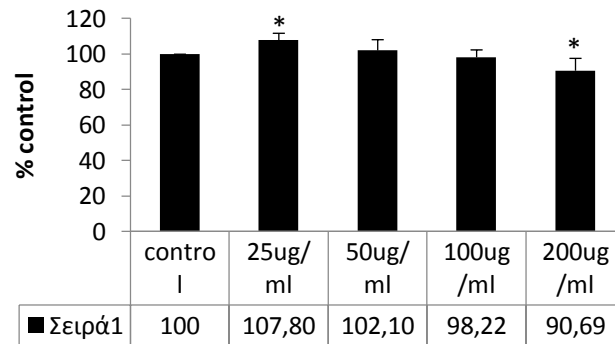
ROS levels, Brazil R2



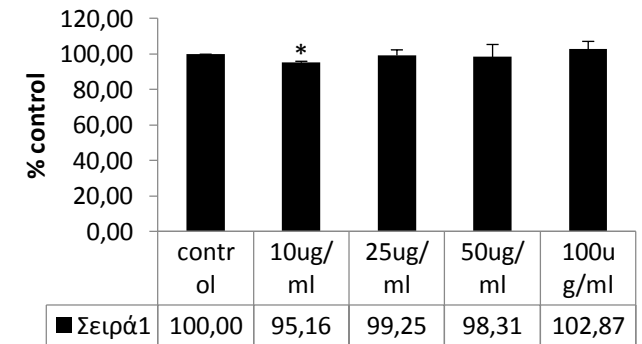
ROS levels, Brazil R3



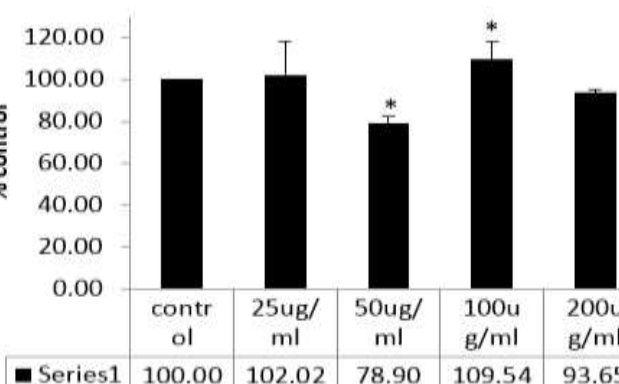
ROS levels, Brazil R4



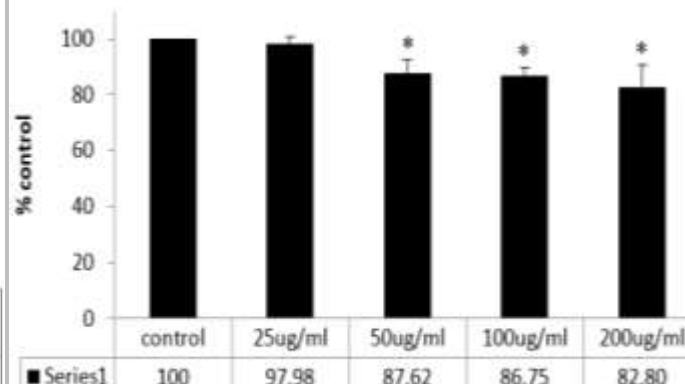
ROS levels, Robusta Green



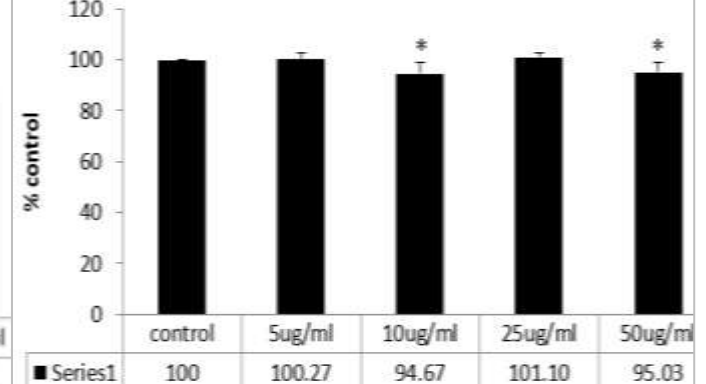
ROS levels, Robusta Roasted



ROS levels, Espresso SWD Green



ROS levels, Espresso SWD Roasted



## Επίπεδα ROS:

Οι περισσότεροι καφέδες προκάλεσαν μια μείωση στα επίπεδα των ROS, από 4.6% έως 32.31%. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τη μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε ανά δείγμα καθώς και τη συγκέντρωση στην οποία αυτή παρατηρήθηκε:

**Πίνακας 8:** Επίπεδα ROS σε C2C12

Δείγμα	Μείωση (%)	Συγκέντρωση
Brazil Green	- (+ 3.41)	50μg/ml
Brazil R1	32.31	50 μg/ml
Brazil R2	4.6	5 μg/ml
Brazil R3	7.91	10 μg/ml
Brazil R4	9.31	200μg/ml
Robusta Green	4.84	10 μg/ml
Robusta Roasted	21.1	50 μg/ml
Espresso SWD Green	17.2	200μg/ml
Espresso SWD Roasted	5.33	10μg/ml

Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί είναι πως υπάρχει μια αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS με το ψήσιμο με εξαίρεση τον Espresso SWD. Οι άψητοι καφέδες είχαν καθόλου (Brazil) ή μικρή (4.84%, Robusta) ικανότητα μείωσης των ROS. Ωστόσο, αυτή αυξήθηκε με το ψήσιμο. Στο Robusta Roasted φαίνεται η μεγαλύτερη μείωση (21.1%). Στον Brazil, μπορούμε να δούμε πως όσο αυξάνει ο χρόνος ψησίματος (από το R4 στο R2) μειώνεται η ικανότητα εξουδετέρωσης των ROS από 9.31% σε 4.6%, αλλά μεγάλη διαφορά γίνεται στον R1 όπου και παρατηρείται μείωση των ROS κατά 32.31% που είναι η μεγαλύτερη σε όλα τα δείγματα καφέ που εξετάστηκαν.

Εξαίρεση σε αυτό αποτελεί ο Espresso SWD καθώς ο άψητος καφές εμφάνισε πιο έντονη μείωση των ROS (17.2%) σε σχέση με τον ψημένο (5.33%). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η μείωση στον ψημένο αφορά συγκέντρωση 20 φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή του πράσινου (10-200μg/ml). Παρ' όλα αυτά, στα 50μg/ml όπου εξετάστηκαν και οι δυο καφέδες ο Green μείωσε τα ROS κατά 12.38% ενώ ο Roasted μόνο κατά 4.97%.

Στα ROS η μείωση, όπου υπήρχε δεν ήταν δοσο-εξαρτώμενη όπως στους μυοβλάστες (με εξαίρεση τους R4 και Espresso Decaf Green). Στους υπόλοιπους καφέδες εμφανίστηκε

μεγαλύτερη ικανότητα μείωσης των ROS σε συγκεντρώσεις μικρότερες των μέγιστων εξεταζόμενων.

Στους R2 & R3 οι μειώσεις παρατηρήθηκαν σε 5-40 φορές μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τους Green, R1 & R4, ενώ στον Robusta η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε σε 5 φορές μικρότερη συγκέντρωση (10μg/ml) σε σχέση με τον αντίστοιχο ψημένο (50μg/ml).

## 5 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δραστικότητα 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 αμάυρωσης 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 οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων, με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του καφέ. Οι μυοβλάστες επιλέχθηκαν καθώς είναι γνωστό ότι κατά την άσκηση παρατηρείται μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους μύες καθιστώντας τους ευαίσθητους σε οξειδωτικές βλάβες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιλέχθηκαν καθώς συγκροτούν το ενδότερο τμήμα των αγγείων και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.

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).

Για να χορηγηθούν τα εκχυλίσματα στις κυτταρικές σειρές, έπρεπε πρώτα να υπολογιστούν οι κυτταροτοξικές τους συγκεντρώσεις, κάτι που έγινε με τη μέθοδο ΧΤΤ. Όσον αφορά τα C2C12, ο Brazil Green εμφάνισε τοξικότητα στα 20  $\mu\text{g/ml}$ , ο Brazil R1 στα 400  $\mu\text{g/ml}$ , ο Brazil R2 στα 800  $\mu\text{g/ml}$ , ο Brazil R3 στα 400  $\mu\text{g/ml}$  και ο Brazil R4 στα 3200  $\mu\text{g/ml}$ . Στα υπόλοιπα δείγματα, ο Robusta Green εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 200  $\mu\text{g/ml}$ , ο αντίστοιχος

καβουρδισμένος στα 1600 µg/ml, ο Espresso SWD Green στα 400 µg/ml και ο καβουρδισμένος στα 1600 µg/ml. Ένα ενδιαφέρον στοιχείο που παρατηρήθηκε ήταν πως τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων εμφάνιζαν κυτταροτοξικότητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους αντίστοιχους καβουρδισμένους. Λόγω έλλειψης στοιχείων σχετικά με τη σύσταση των εκχυλισμάτων δεν είναι εύκολο να γίνουν υποθέσεις σχετικά με αυτή τη διαφορά. Τα μόνα δυο εκχυλίσματα για τα οποία υπάρχουν κάποια δεδομένα είναι το Brazil Green και το Brazil R4, τα οποία γνωρίζουμε ότι έχουν την ίδια ποσότητα καφεΐνης, ωστόσο υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση χλωρογενικών οξέων (CGA). Αναλυτικότερα, ο Brazil Green περιείχε 2028 ppm CGA, ενώ ο Brazil R4 περιείχε 38,8 ppm CGA, δηλαδή 52 φορές μικρότερη ποσότητα (Priftis et al. 2015). Με βάση τη βιβλιογραφία, η μείωση είναι αναμενόμενη, ωστόσο δε σημαίνει ότι έχουν καταστραφεί όλα τα χλωρογενικά οξέα του καβουρδισμένου καφέ, καθώς ένα σημαντικό μέρος μπορεί να έχει ενσωματωθεί στις μεγαλομοριακές δομές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τις μελανοϊδίνες. Τα χλωρογενικά καθώς είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα σε αντίθεση με τις μελανοϊδίνες. Αυτό ίσως θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορά στην κυτταροτοξικότητα, καθώς η συσσώρευση εντός των κυττάρων των CGA του Brazil Green πιθανόν να οδηγεί στην παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος σε σχέση με τους καβουρδισμένους. Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε δυο εκχυλίσματα καβουρδισμένου καφέ (Robusta, Brazil R4) παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με τα control κύτταρα στα οποία δε χορηγήθηκε εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα, αυτό παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των 100, 200 και 400 µg/ml στον Brazil R4 και στις συγκεντρώσεις των 50 και 100 µg/ml στον Robusta Roasted. Αυτή η παρατήρηση είναι ενδιαφέρουσα και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Όσον αφορά τα EA.hy926, ο Brazil Green εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 400 µg/ml, Brazil R1 στα 400 µg/ml, ο Brazil R2 στα 100 µg/ml, ο Brazil R3 στα 50 µg/ml και ο Brazil R4 στα 400 µg/ml. Στα υπόλοιπα δείγματα, ο Robusta Green εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 200 µg/ml, ο αντίστοιχος καβουρδισμένος στα 400 µg/ml, ο Espresso SWD Green εμφάνισε στα 400 µg/ml και ο καβουρδισμένος στα 100 µg/ml. Όπως φαίνεται, στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται καθώς τα εκχυλίσματα των πράσινων κόκκων δεν



εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα καβουρδισμένα, με εξαίρεση τον Robusta. Αναλυτικότερα, σε σχέση με τη κυτταρική σειρά των μιοβλαστών, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φάνηκε να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα εκχυλίσματα των καβουρδισμένων καφέδων, καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση εμφάνισης κυτταροτοξικότητας. Σε αντίθεση, τα εκχυλίσματα των πράσινων καφέδων όσον αφορά τους Robusta και Espresso SWD ήταν τοξικά στις ίδιες συγκεντρώσεις, ενώ στον Brazil χρειάστηκε είκοσι φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση για να εμφανιστεί τοξικότητα. Στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, δε παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στη βιωσιμότητα σε σχέση με τους μιοβλάστες. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως η μέθοδος ΧΤΤ δεν υποδηλώνει απαραίτητα την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας, αλλά θα μπορούσε να υποδηλώνει και αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το οποίο όμως δε μπορεί να διαπιστωθεί. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών πιθανότατα οφείλονται στη διαφορετική ικανότητα απορρόφησης και μεταβολισμού ξενοβιοτικών μορίων καθώς και στους διαφορετικούς μεμβρανικούς υποδοχείς που διαθέτουν. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι η μια κυτταρική σειρά αφορά κύτταρα που προέρχονται από ποντικό, ενώ η άλλη από άνθρωπο.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας τη συγκέντρωση που το κάθε εκχύλισμα εμφανίζει τοξικότητα στην κάθε κυτταρική σειρά, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που θα χορηγούνταν στις καλλιέργειες ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στα επίπεδα GSH και ROS με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά των μιοβλαστών, τα επίπεδα της GSH έδειξαν αύξηση σε όλα τα εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολή των επιπέδων της GSH στον Brazil εμφάνιζε 'καμπανοειδές' σχήμα, δηλαδή η μέγιστη αύξηση GSH που παρατηρούνταν μειωνόταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι μέχρι ενός επιπέδου οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο πάνω από μια τιμή συγκέντρωσης μπορούν να μετατραπούν σε προοξειδωτικές, οδηγώντας στην παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης. Για τον Brazil Green το μέγιστο ήταν στα 2,5 μg/ml που η GSH αυξήθηκε κατά 65,9 % , για τον Brazil R1 στα 100 μg/ml με αύξηση 65,9%, για τον Brazil R2 στα 200 μg/ml με αύξηση 36,2%, για τον Brazil R3 στα 100 μg/ml με αύξηση 33% και τέλος για τον Brazil R4 στα 400 μg/ml με αύξηση 70%. Η αύξηση που προκάλεσε ο Brazil R4 ήταν η μεγαλύτερη που παρατηρήθηκε τόσο σε σχέση με τα υπόλοιπα

εκχυλίσματα, όσο και με τα αποτελέσματα στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Όμως, σε σχέση με τη συγκέντρωση, το πιο αποτελεσματικό εκχύλισμα στην αύξηση της GSH φάνηκε να είναι ο Brazil Green, καθώς την αύξησε κατά 65,9% στα 2,5 µg/ml, συγκέντρωση η οποία είναι 40 με 320 φορές μικρότερη από τις συγκεντρώσεις με τη μέγιστη αύξηση στα υπόλοιπα δείγματα. Στα εκχυλίσματα Robusta και Espresso SWD δεν εμφανίστηκε καμπανοειδές μοτίβο, αλλά η αύξηση ήταν μεγαλύτερη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος (δοσο-εξαρτώμενη αύξηση). Ο Robusta Green εμφάνισε μέγιστη αύξηση GSH 61,9% στα 100 µg/ml και ο Roasted 63,5% στα 800 µg/ml, ο Espresso SWD Green 50,2% στα 100 µg/ml και ο καβουρδισμένος 58,45% στα 800 µg/ml. Συνολικά, το καβούρδισμα φάνηκε να μειώνει τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων, καθώς τα εκχυλίσματα των καβουρδισμένων κόκκων χρειάστηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές των πράσινων ώστε να επιτευχθεί αύξηση της GSH. Σημαντικό είναι επίσης ότι, όπως παρατηρήθηκε από τον Espresso SWD, η απουσία καφεΐνης δεν επηρέασε ιδιαίτερα την ικανότητα του καφέ να αυξάνει τη GSH.

Τα ROS δεν εμφάνισαν μείωση σε όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στον Brazil Green και Brazil R4 δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδά τους, ενώ στον Espresso SWD Green παρατηρήθηκε αύξηση 4,45% στη συγκέντρωση 50 µg/ml. Η μέγιστη μείωση στον Brazil R1 15,9% παρατηρήθηκε στα 200 µg/ml, στον Brazil R2 ήταν 13,6% στα 200 µg/ml, στον Brazil R3 ήταν 3,3% στα 100 µg/ml, στον Robusta Green ήταν 7% στα 25 µg/ml, στον Robusta Roasted ήταν 17,7% στα 800 µg/ml και στον Espresso SWD Roasted ήταν 15,11% στα 800 µg/ml. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι όπου υπήρχε μείωση, αυτή ήταν δοσο-εξαρτώμενη και επιπλέον φαίνεται το καβούρδισμα να αυξάνει την ικανότητα μείωσης. Στον Brazil συγκεκριμένα, με αύξηση του χρόνου καβουρδίσματος παρατηρήθηκε αύξηση της ικανότητας μείωσης των ROS. Στο Robusta Green είναι ενδιαφέρον πως η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε σε 32 φορές μικρότερη συγκέντρωση (25µg/ml) σε σχέση με τον αντίστοιχο καβουρδισμένο (800µg/ml) αν και αξίζει να σημειωθεί πως η μείωση στον πράσινο δεν ήταν αξιόλογη καθώς ήταν στα επίπεδα του 7%. Επίσης, από τα αποτελέσματα στον Espresso SWD προκύπτει ότι η απουσία καφεΐνης δεν επηρεάζει την ικανότητα εξουδετέρωσης των ROS.

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά EA.hy926, τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα εξαιρουμένου του Brazil R2 που δε παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Στα δείγματα του Brazil R3 , R4 καθώς και στους Robusta παρατηρήθηκε το καμπανοειδές μοτίβο μεταβολής επιπέδων GSH που είχε παρατηρηθεί σε όλους τους Brazil στην κυτταρική σειρά C2C12. Στους Brazil Green, R1 και Espresso SWD Green παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση επιπέδων GSH. Πιο αναλυτικά, ο Brazil Green εμφάνισε μέγιστη αύξηση GSH 24,4% στα 100 µg/ml, ο Brazil R1 13,7% στα 25 µg/ml, ο Brazil R3 ήταν 12,1% στα 10 µg/ml, ο Brazil R4 19,7% στα 25 µg/ml, ο Robusta Green 25,9% στα 25 µg/ml, ο Robusta Roasted 39,5% στα 50 µg/ml, ο Espresso SWD Green 30,5% στα 200 µg/ml και ο Espresso SWD Roasted ήταν 39,3% στα 50 µg/ml. Σε αντίθεση με τους μωβλάστες, το καβούρδισμα φάνηκε να αυξάνει τη δραστικότητα στο Brazil, καθώς χρειάστηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί σημαντική αύξηση στα επίπεδα GSH (με εξαίρεση το R2). Ωστόσο, η αύξηση ήταν μικρότερη από αυτή που παρατηρείται στο εκχύλισμα των πράσινων κόκκων. Υπήρχε παρόλα αυτά και μια ομοιότητα με τα αποτελέσματα στους μωβλάστες, καθώς τα R1 και R4 εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τα R2 & R3. Αύξηση δραστικότητας παρατηρήθηκε και σε Robusta και Espresso SWD καθώς οι καβουρδισμένοι εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τους πράσινους. Από τα αποτελέσματα του Espresso SWD προκύπτει πως η απουσία καφεΐνης δε φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα αύξησης της GSH. Τέλος, στην χαμηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε στον R3 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων GSH κατά 11.4%.

Τα ROS εμφάνισαν μείωση σε όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, εκτός από τον Brazil Green που παρατηρήθηκε αύξηση 3,4% στα 50 µg/ml. Η μέγιστη μείωση στον Brazil R1 32,31% παρατηρήθηκε στα 50 µg/ml, στον Brazil R2 ήταν 4,6% στα 5 µg/ml, στον Brazil R3 ήταν 7,91% στα 10 µg/ml, , στον Brazil R4 ήταν 9,31% στα 200 µg/ml, στον Robusta Green ήταν 4,84% στα 10 µg/ml, στον Robusta Roasted ήταν 21,1% στα 50 µg/ml, στον Espresso SWD Green ήταν 17,2% στα 200 µg/ml και στον Espresso SWD Roasted ήταν 5,33% στα 10 µg/ml. Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί είναι πως υπάρχει μια αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS με το καβούρδισμα με εξαίρεση τον Espresso SWD, το οποίο παρατηρήθηκε και στους μωβλάστες. Οι πράσινοι καφέδες είχαν καθόλου (Brazil) ή μικρή (4.84% ,Robusta) ικανότητα μείωσης των ROS. Στους Brazil, μπορούμε να δούμε πως όσο

αυξάνει ο χρόνος καβουρδίσματος (από το R4 στο R2) μειώνεται η ικανότητα εξουδετέρωσης των ROS από 9.31% σε 4.6%, αλλά στον R1 που είναι το δείγμα με το μεγαλύτερο χρόνο καβουρδίσματος, παρατηρείται μείωση των ROS κατά 32.31% που είναι η μεγαλύτερη από όλα τα δείγματα καφέ που εξετάστηκαν. Ο Espresso SWD που είναι εξαίρεση όπως αναφέραμε, καθώς ο καβουρδισμένος εμφάνισε μικρότερη μείωση από τον πράσινο, όμως η μείωση αυτή παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 20 φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή του πράσινου. Παρ' όλα αυτά, στα 50μg/ml όπου εξετάστηκαν και οι δυο καφέδες ο Green μείωσε τα ROS κατά 12.38% ενώ ο Roasted μόνο κατά 4.97%. Η μείωση των ROS, όπου υπήρχε δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη όπως στους μυοβλάστες, με εξαίρεση τους R4 και Espresso SWD. Στα υπόλοιπα δείγματα εμφανίστηκε μεγαλύτερη ικανότητα μείωσης των ROS σε συγκεντρώσεις μικρότερες των μέγιστων εξεταζόμενων. Αυτό το φαινόμενο ίσως σχετίζεται και πάλι με την μετατροπή της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών σε προοξειδωτική, οδηγώντας έτσι σε αύξηση των επιπέδων των ROS. Στους R2 & R3 οι μειώσεις παρατηρήθηκαν σε 5-40 φορές μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τους Green, R1 & R4, ενώ στον Robusta η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε σε 5 φορές μικρότερη συγκέντρωση (10μg/ml) σε σχέση με τον αντίστοιχο καβουρδισμένο (50μg/ml).

Συνολικά, από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, φάνηκε πως τα περισσότερα εκχυλίσματα μπορούν να βελτιώσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των δυο υπό μελέτη κυτταρικών σειρών, καθώς αύξησαν τα επίπεδα GSH και μείωσαν τα επίπεδα των ROS. Η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια συμμετέχοντας στην άμυνα του κυττάρου έναντι των βλαβερών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Έτσι, η αύξησή της που παρατηρήθηκε (σε ποσοστό έως 70%) υποδηλώνει τη βελτίωση της κυτταρικής άμυνας. Όσον αφορά τα ROS, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων οδήγησε σε μικρή μείωσή τους. Θα πρέπει να εξεταστεί αν η αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων από τα εκχυλίσματα μπορεί να μην μειώνει σε μεγάλο ποσοστό τις ROS, αλλά ίσως να μειώνει τις βλάβες που προκαλούνται από τις ROS (π.χ. λιπιδική υπεροξείδωση, οξείδωση πρωτεϊνών, βλάβες στο DNA).

Εν κατακλείδι, το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι η δυνατότητα του καφέ να βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό θα

μπορούσε να έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις σε αθλητές και άτομα που πάσχουν από καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς ο καφές είναι ήδη ένα πολύ δημοφιλές ρόφημα. Ωστόσο, με βάση τα παραπάνω θα μπορούσαν να προκύψουν δεδομένα για το είδος καφέ, το χρόνο ψησίματος και την ποσότητα κατανάλωσης που απαιτείται για τη βέλτιστη απόκριση του οργανισμού.

## 6 Βιβλιογραφία

- Adlercreutz, H., 2007. Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44(5–6), pp.483–525.
- Bouayed, J. & Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), pp.228–237.
- 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.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), pp.337–353.
- Cavin, C. et al., 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), pp.1155–1163.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- 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.
- 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.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
- Han, X., Shen, T. & Lou, H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. , 2, pp.950–988.
- Harborne, J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.
- Harnly, J.M. et al., 2006. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), pp.9966–9977.
- 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.
- Lattanzio, V. et al., 2006. *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*,
- Liang, N. & Kitts, D.D., 2015. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), pp.1–20.
- 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., 2004a. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Manach, C. et al., 2004b. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Manach, C. et al., 2004c. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Meng, S. et al., 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

- Mennen, L. et al., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), p.326S–329S.
- Moreira, A.S.P. et al., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), p.903.
- Muller, F.L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp.477–503.
- 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. Available at: <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/86/3/604> [Accessed September 8, 2016].
- 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.
- Poljsak, B., 2011a. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Poljsak, B., 2011b. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Priftis, A. et al., 2015. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular medicine reports*, 12(5), pp.7293–7302.
- Quideau, S. et al., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Rinnerthaler, M. et al., 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), pp.287–306.

- 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. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814684900062> [Accessed August 29, 2016].
- Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), pp.1231–1246.
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
- Valko, M. et al., 2006. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40.
- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.
- Adlercreutz, H., 2007. Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44(5–6), pp.483–525.
- Bouayed, J. & Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), pp.228–237.
- 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.
- Di Carlo, G. et al., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), pp.337–353.
- Cavin, C. et al., 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), pp.1155–1163.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- 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.
- 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.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, pp.1–85.
- Han, X., Shen, T. & Lou, H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. , 2, pp.950–988.
- Harborne, J.B., 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.15–24.



- Harnly, J.M. et al., 2006. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), pp.9966–9977.
- 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.
- Lattanzio, V. et al., 2006. *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*,
- Liang, N. & Kitts, D.D., 2015. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), pp.1–20.
- 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., 2004a. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Manach, C. et al., 2004b. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Manach, C. et al., 2004c. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp.727–747.
- Meng, S. et al., 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Mennen, L. et al., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.326S–329S.
- Moreira, A.S.P. et al., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), p.903.
- Muller, F.L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp.477–503.
- 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. Available at: <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/86/3/604> [Accessed September 8, 2016].
- 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.
- Poljsak, B., 2011a. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine*

- and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Poljsak, B., 2011b. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Priftis, A. et al., 2015. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular medicine reports*, 12(5), pp.7293–7302.
- Quideau, S. et al., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Rinnerthaler, M. et al., 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
- Rodrigo, R. et al., 2014. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), pp.304–317.
- Scalbert, A. et al., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), pp.287–306.
- 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. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814684900062> [Accessed August 29, 2016].
- Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), pp.1231–1246.
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40.
- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.