



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Επίδραση εκχυλισμάτων καφέ στην έκφραση αντιοξειδωτικών
γονιδίων σε μυοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα»*

*«Effect of coffee extracts on the expression of antioxidant genes in
myoblasts and endothelial cells»*



Αγγέλη-Τερζίδου Αντωνία-Ευγενία

Λάρισα 2017

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

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

Δημήτριος Κομιώτης: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

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

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

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

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

Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή	2
Ευχαριστίες	3
Περίληψη	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	8
1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	8
1.2.1 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών.....	9
1.3 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα	11
1.4 Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες.....	13
1.5 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών	14
1.6 Πολυφαινόλες.....	15
1.7 Καφές	15
1.8 Αντιοξειδωτικά γονίδια.....	18
1.8.1 Καταλάση (<i>cat</i>)	18
1.8.2 Υπεροξειδική δισμουτάση (<i>sod1</i>)	19
1.8.3 Παραοξονάση (<i>pon-1</i>)	20
1.8.4 Θειρεοδοξίνη (<i>trx</i>).....	21
1.8.5 Οξυγενάση της αίμης (<i>ho-1</i>)	23
1.8.6 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (<i>nrf-2</i>)	24
1.8.7 NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (<i>nqo1</i>)	27
1.8.8 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (<i>γ-gcl</i>)	28
1.8.9 Περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (<i>gpx1</i>).....	28
1.8.10 Αναγωγάση της γλουταθειόνης (<i>gsr</i>)	29
1.8.11 Τρανσφεράση a2 της γλουταθειόνης (<i>gsta-2</i>).....	30
2. Σκοπός.....	31
3. Μεθοδολογία	31
3.1 Αντιδραστήρια	31
3.2 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ.....	31
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926	32
3.4 Απομόνωση ολικού RNA και μετατροπή σε cDNA.....	32
3.5 Real-time PCR	33

4. Αποτελέσματα.....	35
5. Συζήτηση	43
6. Βιβλιογραφία.....	48

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 2 δείγματα καφέ, ένα από πράσινους κόκκους και ένα από τους αντίστοιχους καβουρδισμένους. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις που σε προηγούμενο πείραμα βελτίωναν την οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων και μελετήθηκε η επίδραση τους στην έκφραση γονιδίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, αναλόγως της συγκέντρωσης παρατηρήθηκε καταστολή (σε μικρή συγκέντρωση) ή επαγωγή (σε υψηλότερες) έκφρασης γονιδίων σχετικών με τον μεταβολισμό της γλουταθειόνης αλλά και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με αποτοξινωτικές και αντιοξειδωτικές λειτουργίες στα κύτταρα.

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 the present study 2 coffee samples were examined, one derived from green coffee beans and one from roasted coffee beans. The utilized concentrations exhibited improved redox status upon administration on myoblasts and endothelial cells in a previous study and therefore their effect on gene expression was investigated. According to the results, different concentrations can cause down-regulation (in low concentrations) or induction (in higher concentrations) of gene expression associated to the metabolism of glutathione and other genes linked to detoxifying and antioxidant cell functions.

1. Εισαγωγή

1.1 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).

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).

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 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

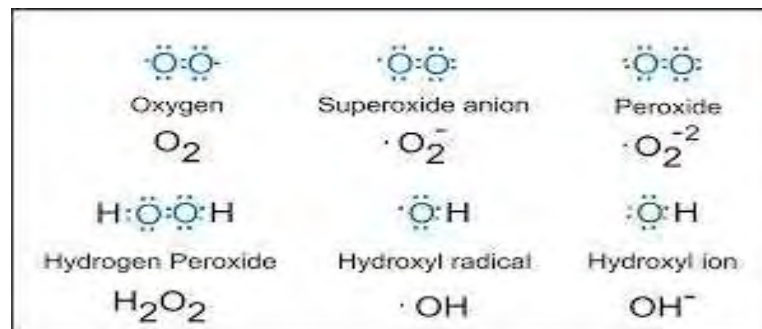
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)

Ρίζα Υπεροξειδίου ($\text{RO}_2\cdot$)	Υποβρωμιώδες Οξύ HOBr
Ρίζα Αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$)	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ($\text{HO}_2\cdot$)	Μονήρες Οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

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.

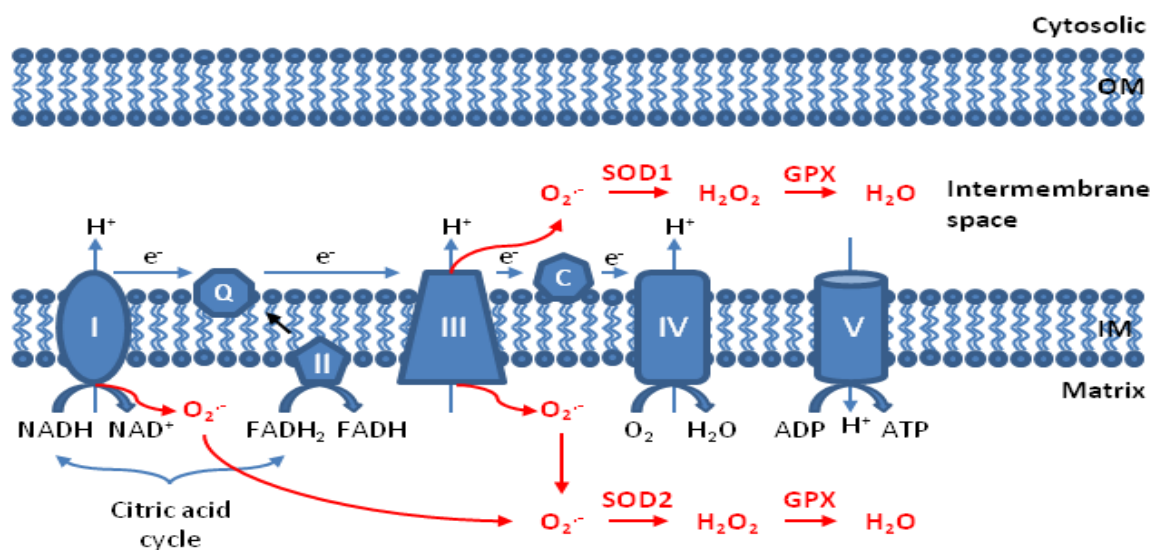
1.2.1 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

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_2 μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγής 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 (Παπαγαλάνης 2014).



Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

Β) 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 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 O₂⁻, το H₂O₂ και το HO[•] (Παπαγαλάνης 2014).

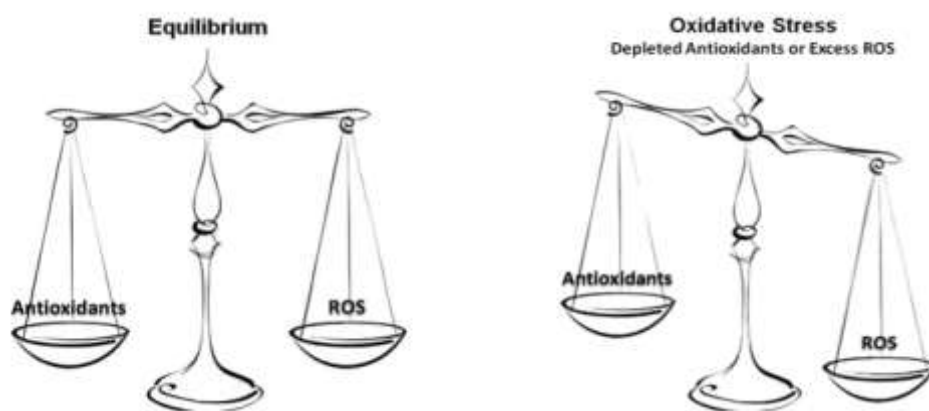
Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαράγοντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια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

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 ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 3: 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).

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.



Εικόνα 4: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

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 2011).



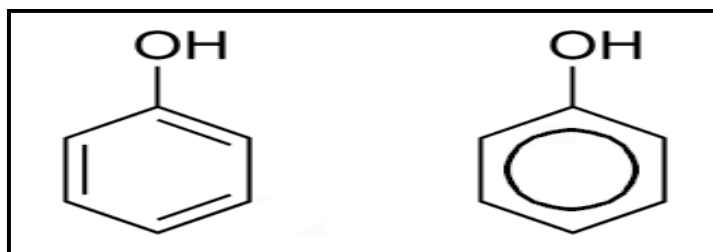
Εικόνα 5 : Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

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 ωοκυττάρου, 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 (Schieber & Chandel 2014).

1.6 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsaο 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 6 : 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.

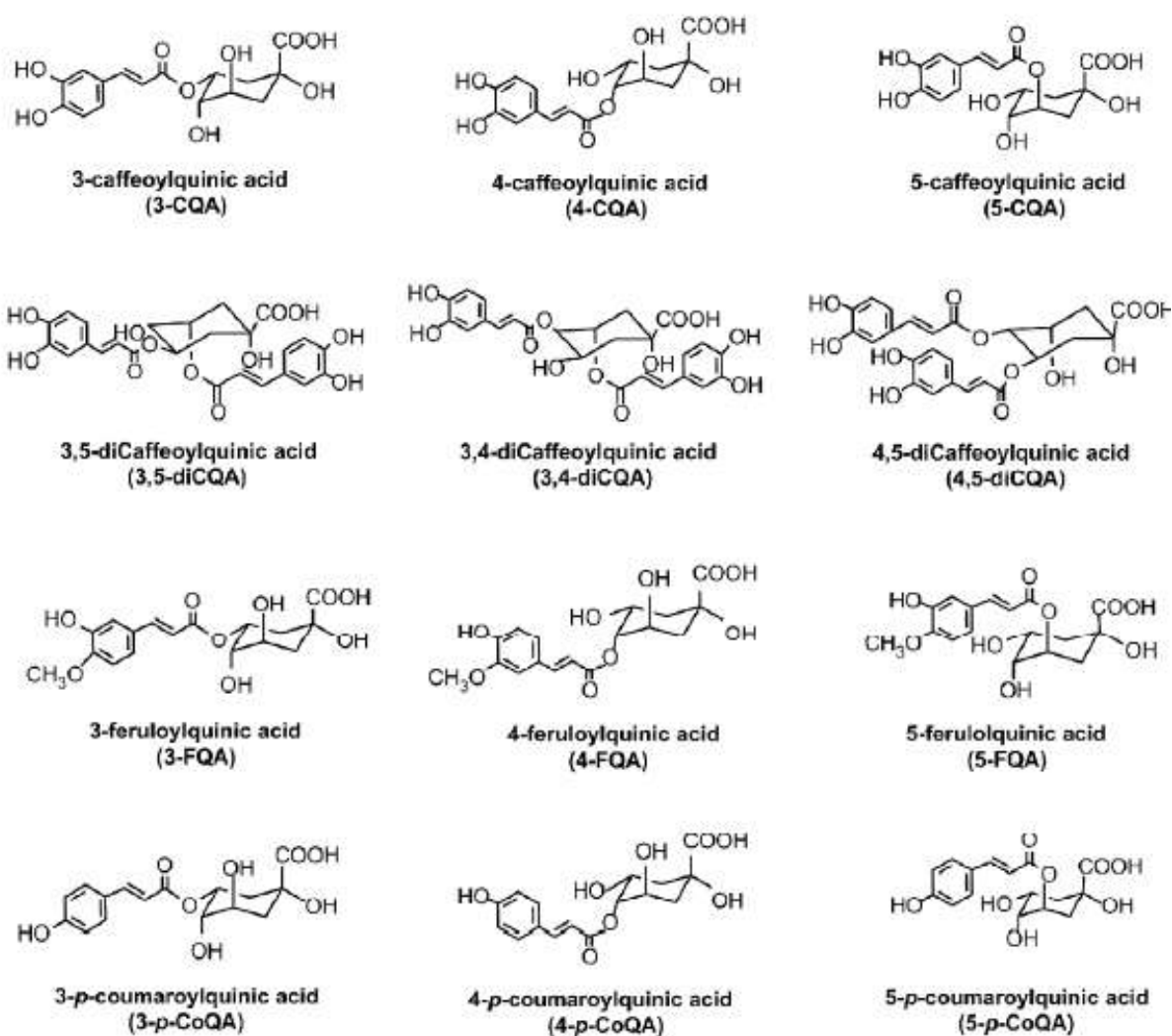
1.7 Καφές

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

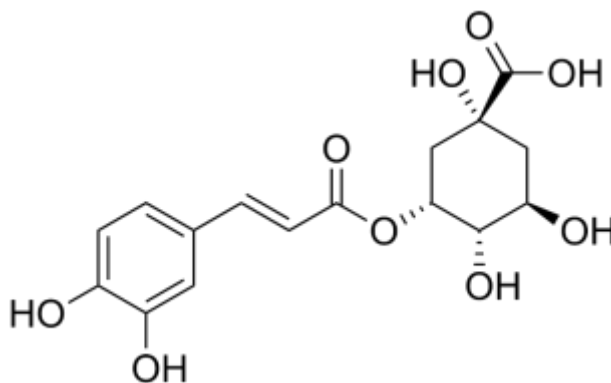
Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης του καφέ έχουν δείξει ότι περιέχει τουλάχιστον χίλιες ενώσεις με ποικιλία δράσεων, εκ των οποίων διάφορα οργανικά οξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και καφεΐνη.

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 7 : Δομές χλωρογενικών οξέων

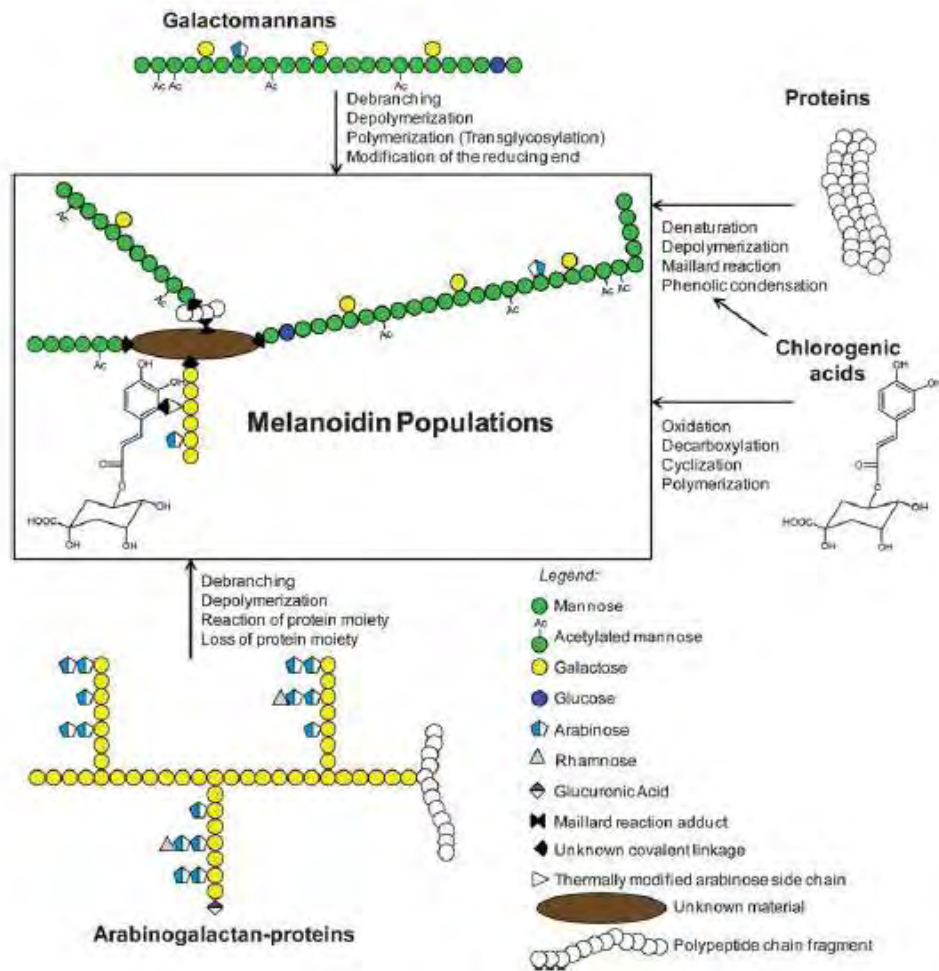
Η πιο άφθονη αυτών είναι το 5-CQA το οποίο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 8: Δομή 5-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 μελανοΐδινες που σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις Maillard (Perrone et al. 2012; Moreira et al. 2012) και υπάρχουν μόρια που παραμένουν ελεύθερα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος, πραγματοποιούνται αντιδράσεις Maillard, δηλαδή αντιδράσεις μεταξύ αμινοξέων και αναγόντων σακχάρων. Μέσω αυτών των αντιδράσεων σχηματίζονται μεγάλου 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 9: Δομή σκελετού μελανοϊδινών που έχει προταθεί

Έχει βρεθεί σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί *in vitro* ότι οι μελανοΐδινες 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)

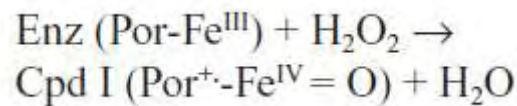
1.8 Αντιοξειδωτικά γονίδια

1.8.1 Καταλάση (*cat*)

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο που περιέχει μία προσθετική ομάδα αίμης σε κάθε υπομονάδα του ενζύμου. Η καταλάση εντοπίζεται στα υπεροξειδώματα και είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Putnam et al. 2000). Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ένζυμο για την προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από ενεργές μορφές οξυγόνου.

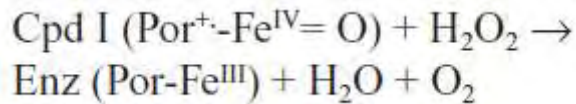


Ο μηχανισμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου αποτελείται από 2 αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση, ο σίδηρος Fe^{3+} της προσθετικής ομάδας της αίμης ανάγει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό με ταυτόχρονη παραγωγή $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$ (ένωση I).



(Chelikani et al. 2004)

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

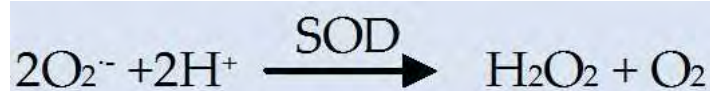


(Chelikani et al. 2004)

Επομένως, έχουμε συνολική παραγωγή 2 μορίων νερού και ενός μορίου μοριακού οξυγόνου (Putnam et al. 2000).

1.8.2 Υπεροξειδική δισμουτάση (*sod1*)

Η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (CuZnSOD, SOD1) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-) σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου.

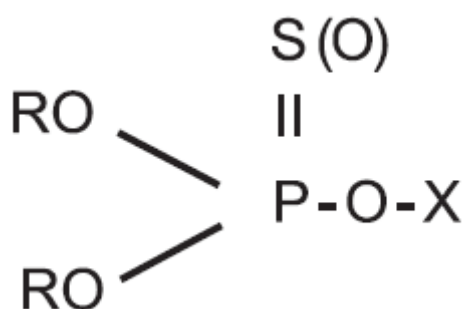


Η SOD1 είναι ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και απαντάται σε διμερή μορφή. Κάθε υπομονάδα του ενζύμου περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο, καθώς και ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των υπομονάδων της (Sea et al. 2015).

Το υπεροξειδίο προκύπτει ως παραπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και είναι ικανό να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες. Συνεπώς, η SOD αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων.

1.8.3 Παραοξονάση (*pon-1*)

Η παραοξονάση (PON1) είναι μία A-εστεράση υπεύθυνη για την υδρόλυση ενεργών μεταβολιτών (oxons) διάφορων οργανοφωσφορικών (OP) εντομοκτόνων. Η PON1 πήρε το όνομα της από την ικανότητα της να υδρολύει το παραοξόν (paraoxon), το πρώτο και πιο καλά μελετημένο υπόστρωμα. Ωστόσο, η PON1 υδρολύει και άλλες οργανοφωσφορικές ενώσεις (Costa et al., 2013).



Εικόνα 10: Γενική δομή οργανοφωσφορικών ενώσεων

(Costa et al. 2005)

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις (OP) είναι τριεστέρες φωσφορικού οξέος. Η γενική τους δομή των OP χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός ατόμου φωσφόρου συνδεδεμένο με διπλό δεσμό με θείο ή με ένα άτομο (Costa et al. 2005).

Η PON1 έχει την ικανότητα να προστατεύει την οξείδωση λιπιδίων. Ωστόσο, παρά το μεγάλο αριθμό ενώσεων που μπορούν να υδρολυθούν από την παραοξονάση, τα βιολογικά υποστρώματα της PON1 δεν έχουν εξακριβωθεί (Litvinov et al. 2012).

Η PON1 συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και ένα μέρος της εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου και σχετίζεται με λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) (Mackness et al. 1998).

Έχει βρεθεί ότι η PON1 απενεργοποιείται σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον (Nguyen & Sok 2003). Για το λόγο αυτό πολλές μελέτες έχουν γίνει για την επίδραση

αντιοξειδωτικών μορίων. Δύο βιταμίνες, το ασκορβικό οξύ (Vit. C) και η α-τοκοφερόλη (Vit. E), αυξάνουν την ενεργότητα της PON1 σε ζώα, αλλά η επίδραση τους σε ανθρώπους είναι αβέβαιη (Lucio G. Costa et al., 2013).

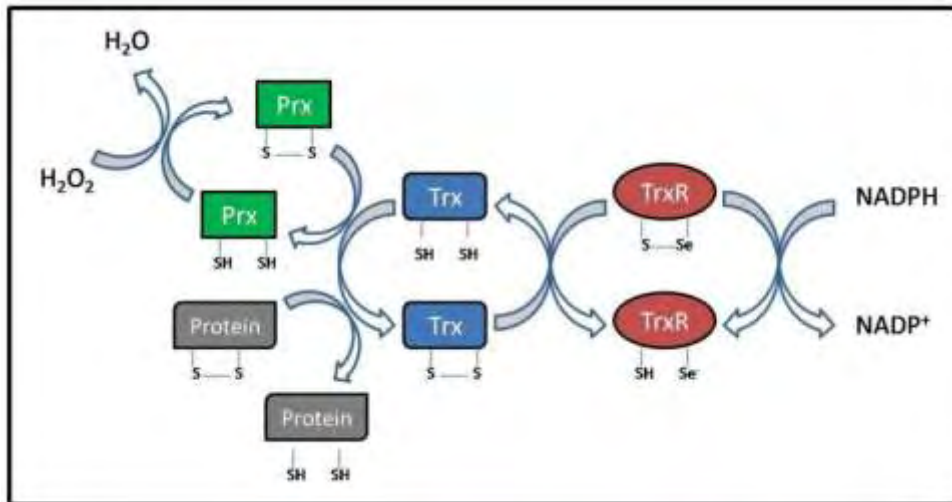
Δύο πολυμορφισμοί είναι παρόντες στο γονίδιο της PON1: μία Gln(Q)/Arg(R) υποκατάσταση στη θέση 192 και μία Leu(L)/Met(M) υποκατάσταση στη θέση 55. Ο Q/R πολυμορφισμός επηρεάζει την καταλυτική δράση της PON1, ενώ ο L/M πολυμορφισμός σχετίζεται με τα επίπεδα της PON1 στο πλάσμα, με την PON1M55 να συνδέεται με χαμηλή πλασματική PON1 (Costa et al. 2005).

1.8.4 Θειροδοξίνη (trx)

Η θειροδοξίνη είναι μία μικρή πρωτεϊνική αναγωγάση, ο ρόλος της οποίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων σε πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την αναγωγή τους. Το σύστημα της θειροδοξίνης καταλύει την αναγωγή εκτεθειμένων δισουλφιδικών δεσμών μέσω του NADPH (Holmgren 1989).

Οι πρωτεΐνες στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ή στην επιφάνεια του κυττάρου είναι πλούσιες σε δισουλφίδια, αντανακλώντας το οξειδωτικό περιβάλλον. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες του εσωτερικού του κυττάρου βρίσκονται σε ανηγμένη μορφή και περιέχουν ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες. Η κύρια αναγωγάση δισουλφιδικών δεσμών, υπεύθυνη για την διατήρηση των πρωτεϊνών σε ανηγμένη μορφή, είναι η θειροδοξίνη (Elias S. J. ArneÅr and Arne Holmgren 2000). Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό μηχανισμό της μεταγωγής σήματος και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

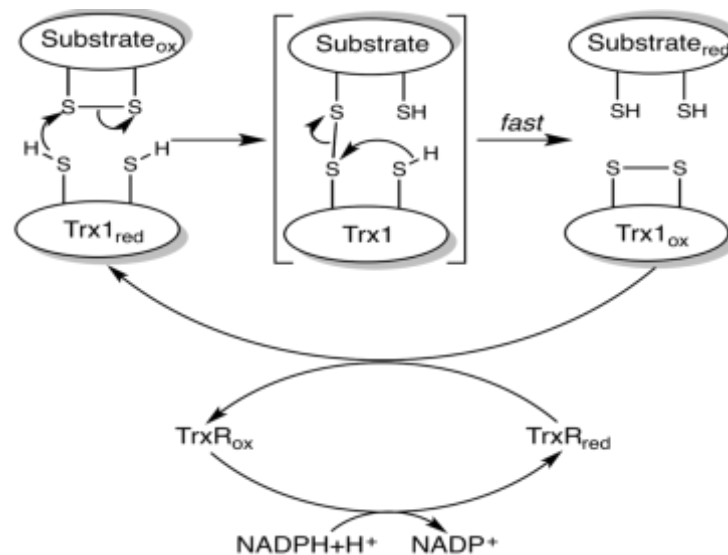
Η Trx-1 περιέχει τη συντηρημένη αλληλουχία -Cys-Gly-Pro-Cys- στο ενεργό της κέντρο, υπεύθυνη για τη δράση της ως πρωτεϊνική οξειδοαναγωγάση (Nordberg & Arner 2001). Τα κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι απαραίτητα για τη δράση της Trx1, ενώ τα υπόλοιπα δύο κατάλοιπα δεν απαιτούνται για τη δράση του ενζύμου, αλλά ευθύνονται για τις θερμοδυναμικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες της πρωτεΐνης (Collet & Messens 2010).



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης Trx

(Karlenius & Tonissen 2010)

Ο μηχανισμός δράσης της θειορεδοξίνης περιλαμβάνει την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, όπως η Prx (περοξυρεδοξίνη) από την ανηγμένη Trx. Κατά τη διαδικασία αυτή, η Trx οξειδώνεται και επανακυκλώνεται από την TrxR (αναγωγάση της Trx), η οποία επαναφέρει την Trx στην ανηγμένη της μορφή με την κατανάλωση NADPH (Karlenius & Tonissen 2010).



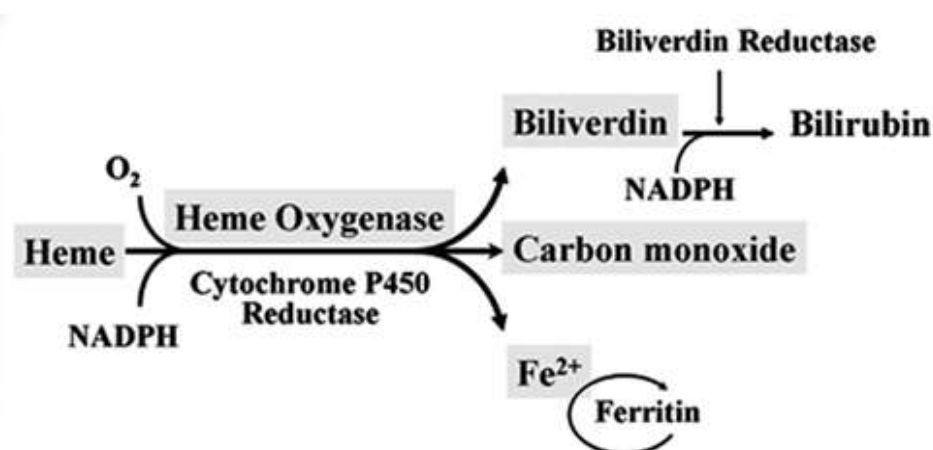
Εικόνα 12: Μεταβολές στο ενεργό κέντρο της Trx κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων

Ο ρόλος της Trx1 είναι η αναγωγή οξειδωμένων πρωτεϊνών και η διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την «προσβολή» του δισουλφιδίου της πρωτεΐνης-στόχου από τη Ν-τελική θειόλη του μοτίβου CGPC της

Trx1, απελευθερώνοντας μία ελεύθερη θειόλη και δημιουργώντας ένα νέο δισουλφίδιο μεταξύ της Trx1 και της πρωτεΐνης-στόχου. Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες, το θείο της N-τελικής Cys της Trx1 υπάρχει ως θειολικό, επιτρέποντας στο κατάλοιπο να δράσει ως πυρηνόφιλο και να «επιτεθεί» σε δισουλφίδια πρωτεϊνών. Μετά το σχηματισμό δισουλφιδίου μεταξύ της Trx1 και της πρωτεΐνης-στόχου, η C-τελική θειόλη πρέπει να ενεργοποιηθεί ως θειολικό προκειμένου να προκαλέσει τη διάσπαση του συμπλόκου. Το τελευταίο βήμα της καταλυτικής δράσης του ενζύμου περιλαμβάνει την «προσβολή» της N-τελικής Cys της Trx1 από την C-τελική Cys, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ανηγμένης πρωτεΐνης-στόχου και της οξειδωμένης Trx1. Ακολούθως, η Trx1 ανάγεται από την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR) με την κατανάλωση NADPH, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο αντίδρασης (Collet & Messens 2010).

1.8.5 Οξυγενάση της αίμης (*ho-1*)

Η οξυγενάση της αίμης (HO-1) είναι ένα επαγωγίμο ένζυμο του μονοπατιού καταβολισμού της αίμης. Το σύστημα της HO-1 αποτελείται από την HO-1 και την NADPH-cyt P450 αναγωγή και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό της αίμης (Kikuchi et al. 2005).



Εικόνα 13: Προϊόντα αντίδρασης HO-1

Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης είναι η χολοπρασίνη, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και ο Fe²⁺. Η HO-1 λειτουργεί ως αμυντικός κυτταρικός μηχανισμός απέναντι στο οξειδωτικό στρες, καθώς η χολοπρασίνη και η χολερυθρίνη (προϊόν

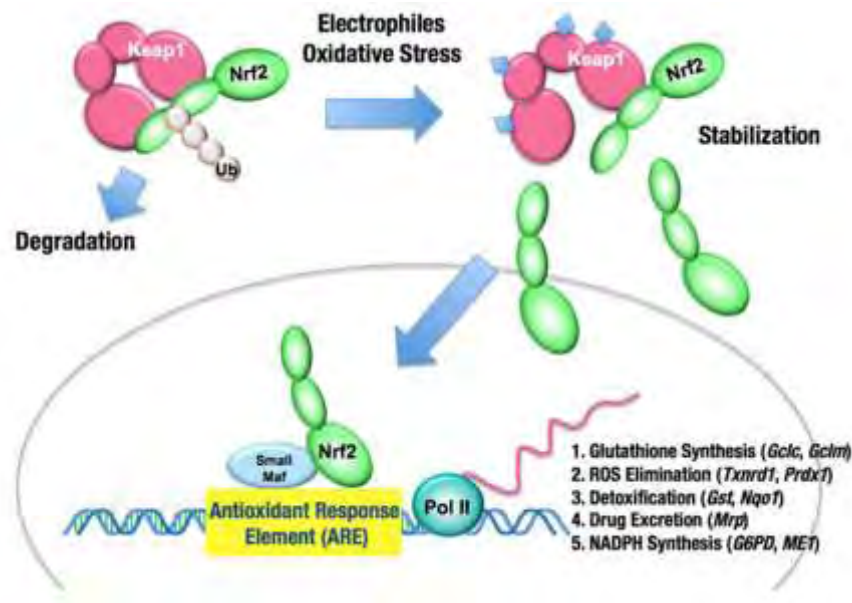
μεταβολισμού της χολοπρασίνης) λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Kikuchi et al. 2005).

Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) είναι ένα άχρωμο και άοσμο αέριο, γνωστό για τις θανατηφόρες ιδιότητες του. Ωστόσο, χαμηλές συγκεντρώσεις CO ασκούν διάφορες βιολογικές δράσεις, όπως δράση ως νευροδιαβιβαστής, προστασία εναντίον κυτταρικού θανάτου και οξειδωτικού στρες, δράση ως αντιφλεγμονώδες, ανοχή στη μεταμόσχευση οργάνων κ.ά. (Morse & Choi 2005). Η χολοπρασίνη, πρόδρομο μόριο της χολερυθρίνης, έχει βρεθεί πως διαθέτει αντικές ιδιότητες και δρα ως αντιοξειδωτικό (Morse & Choi 2005). Ο ελεύθερος Fe είναι ικανός να συμμετέχει σε διάφορες δηλητηριώδεις αντιδράσεις οξείδωσης (π.χ. αντίδραση Fenton) και γι' αυτό το λόγο πρέπει να απομακρύνεται από τα βιολογικά συστήματα. Μέσω της απελευθέρωσης Fe από την αίμη, η HO-1 συμβάλλει στη δημιουργία προοξειδωτικής κατάστασης στο κύτταρο. Ωστόσο, ο Fe που απελευθερώνεται από τη δράση της HO-1 αυξάνει τη σύνθεση φερριτίνης, η οποία αποθηκεύει τον ελεύθερο Fe και προστατεύει το κύτταρο (Morse & Choi 2005).

Η επαγωγίμη μορφή HO-1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο σπλήνα και σε άλλους ιστούς υπεύθυνους για τον καταβολισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων (Ryter et al. 2006). Η HO-1 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ryter et al. 2006).

1.8.6 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (nrf-2)

Το γονίδιο Nrf2 κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα-μέλος της μικρής ομάδας των basic leucine zipper (bZIP) πρωτεϊνών. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο στην βασική και επαγωγίμη έκφραση γονιδίων ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Mitsuishi et al. 2012).



Εικόνα 14: Μηχανισμός ρύθμισης Nrf2

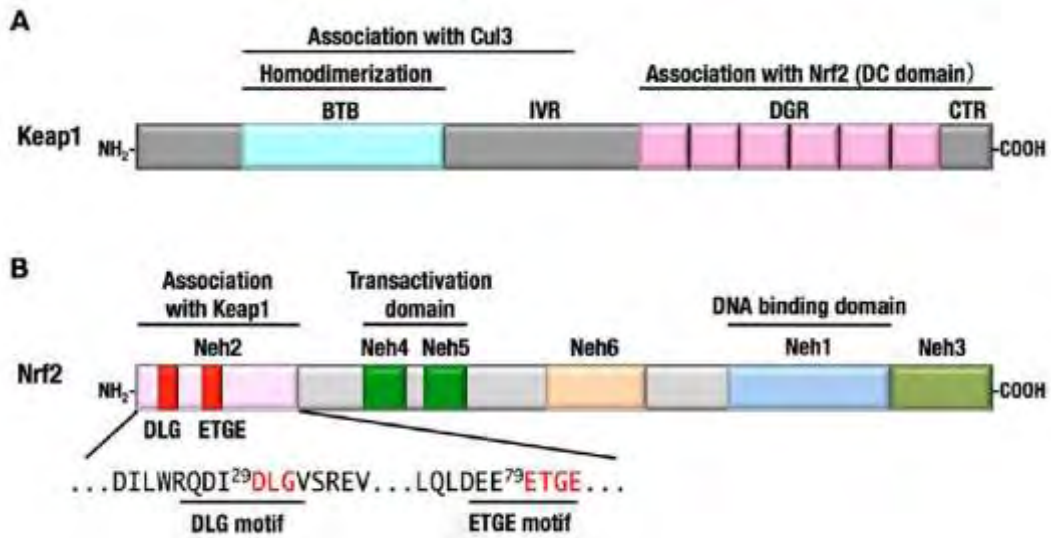
(Mitsuishi et al. 2012)

Η πρωτεΐνη Keap1 είναι πολύ σημαντική για τη ρύθμιση της ενεργότητας της Nrf2. Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της Keap1 και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Μετά από έκθεση σε ηλεκτρόφιλα ή ROS, η Keap1 απενεργοποιείται και ο Nrf2 σταθεροποιείται. Συνεπώς, ο Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και ενεργοποιεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως NQO-1, GSTa2, HO-1 κ.ά. (Mitsuishi et al. 2012).

Τα γονίδια-στόχοι του Nrf2 εμπλέκονται στη σύνθεση γλουταθειόνης, στην εξουδετέρωση των ROS, στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών και φαρμάκων (Mitsuishi et al. 2012).

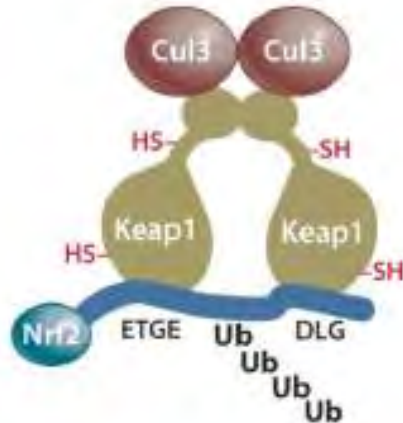
Ο Nrf2 ελέγχει την έκφραση γονιδίων μέσω των ARE περιοχών. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στους υποκινητές κυτταροπροστατευτικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων (Itoh et al. 1999).

Μετά την είσοδο του στον πυρήνα, ο Nrf2 συνδέεται με τις μικρές Maf πρωτεΐνες προκειμένου να οδηγήσει στην ενεργοποίηση γονιδίων. Οι μικρές Maf πρωτεΐνες είναι περιέχουν μία bZIP περιοχή σύνδεσης με το DNA και διμερίζονται, αλλά στερούνται την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης όπως οι μεγάλες Maf πρωτεΐνες. Οι μικρές Maf πρωτεΐνες δρουν ως συνενεργοποιητές για μεγάλες bZIP πρωτεΐνες και συνδέονται σε GC δινουκλεοτίδια των ARE (Qiang Ma, 2013).



Εικόνα 15: Δομή γονιδίων keap1 και nrf2

(Mitsuishi et al. 2012)



Εικόνα 16: Σύνδεση Keap1-Nrf2

(Qiang Ma, 2013)

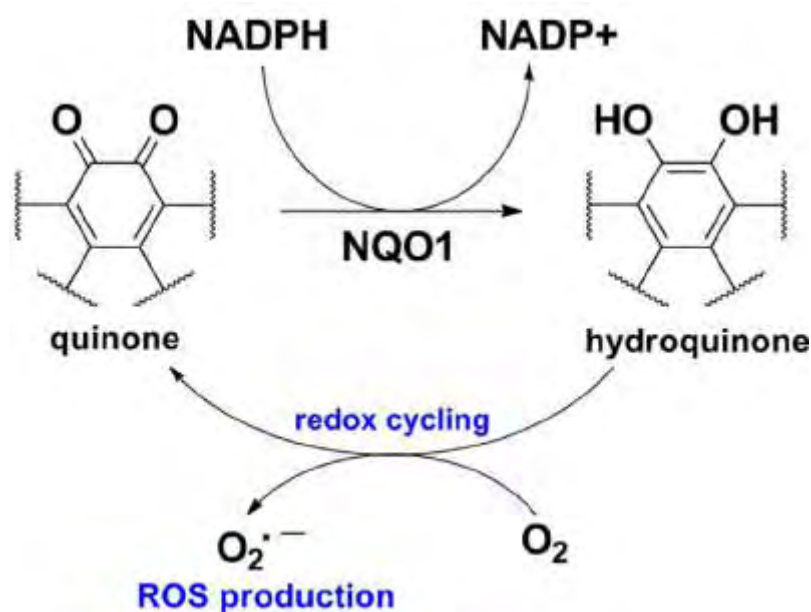
Μέσω των περιοχών BTB της N-τελικής περιοχής, η Keap1 συνδέεται με την E3 λιγάση. Δύο μόρια Keap1 συνδέονται και δημιουργούν ένα διμερές μέσω των BTB περιοχών της N-τελικής πλευράς, ενώ οι DC περιοχές του C-τελικού άκρου βρίσκονται σε απόσταση. Οι δύο DC περιοχές του C-τελικού άκρου του διμερούς Keap1 συνδέονται με ένα μόριο Nrf2. Η Neh2 περιοχή του N-τελικού άκρου του Nrf2

συνδέεται με τις DC περιοχές σε δύο διαφορετικά σημεία, τις ETGE και DLG μοτίβα (Mitsuishi et al. 2012). Συνεπώς, ο Nrf2 συνδέεται με την Keap1 σε αναλογία 1:2 (Ma 2013).

Υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρόφιλων τροποποιούν όχι μόνο την Keap1, αλλά και πολλά κυτταρικά συστατικά, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια, γεγονός που επηρεάζει τη λειτουργία του κυττάρου. Λόγω της ύπαρξης κυστεϊνικών καταλοίπων στην Keap1, το σύστημα Keap1-Nrf2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε χαμηλά επίπεδα ηλεκτρόφιλων και ενεργοποιεί τους κυτταροπροστατευτικούς μηχανισμούς για την αποφυγή κυτταρικών βλαβών (Mitsuishi et al. 2012).

1.8.7 NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (nqo1)

Η NAD(P)H-αφυδρογονάση των κινονών (NQO-1) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο καταλύει την αναγωγή ενδογενών ή εξωγενών κινονών χρησιμοποιώντας το FAD σαν συνένζυμο. Η NQO-1 υφίσταται ως ομοδιμερές και χρησιμοποιεί το NADH ή NADPH ως αναγωγικό παράγοντα. Η έκφραση του ενζύμου ελέγχεται από το μονοπάτι Nrf2/Keap1/ARE (Atia et al. 2014).



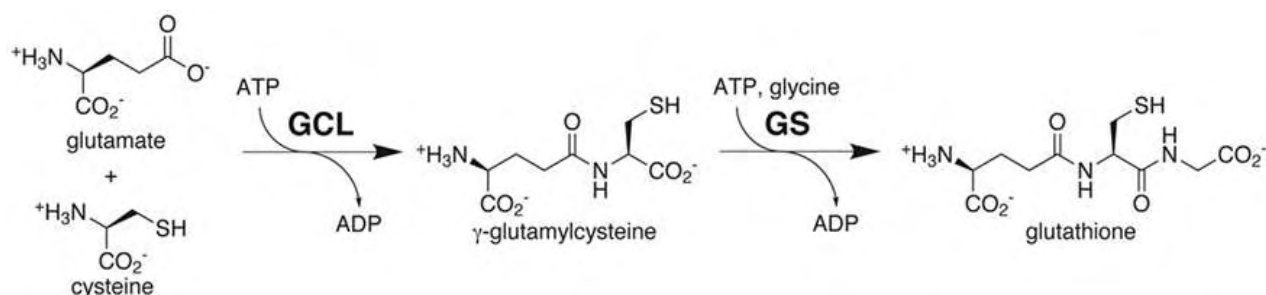
Εικόνα 17: Μηχανισμός δράσης NQO-1

Η NQO-1 θεωρείται ένζυμο μεταβολισμού της φάσης I. Ο ρόλος του είναι η μετατροπή των κινονών στις λιγότερο δραστικές υδροκινόνες. Οι κινόνες είναι

παράγωγα αρωματικών ενώσεων στα οποία έχουν αντικατασταθεί υδρογόνα από οξυγόνα και είναι ικανά να οδηγήσουν στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η μεταφορά 2 ή 4 ηλεκτρονίων από την NQO-1 στις κινόνες έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των υδροκινονών, μορφές λιγότερο δραστικές. Συνεπώς, η NQO-1 προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες καθώς παρεμποδίζει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Atia et al. 2014).

1.8.8 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (*γ-gcl*)

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της GSH καταλύεται από τη λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (*γ-GCL*). Η *γ-GCL* είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο αποτελούμενο από την καταλυτική (*GCLC*) και τη ρυθμιστική υπομονάδα (*GCLM*). Οι δύο υπομονάδες του ενζύμου εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Franklin et al. 2009).

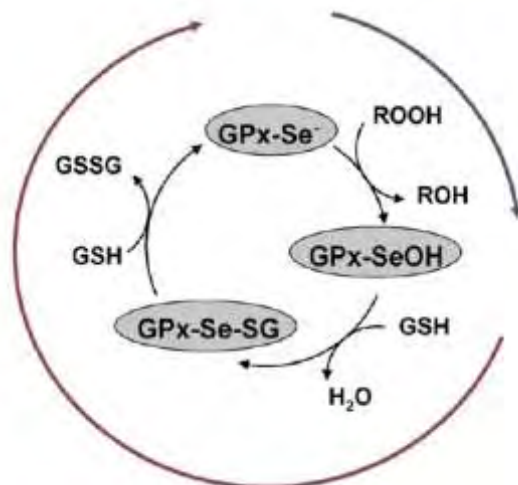


Εικόνα 18: Αντιδράσεις παραγωγής GSH

Το πρώτο και αργό βήμα της σύνθεσης της γλουταθειόνης καταλύεται από τη *γ-GCL*. Η σύνθεση της GSH ολοκληρώνεται με την προσθήκη γλυκίνης στη *γ-γλουτάμυλοκυστεΐνη* από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (*GS*).

1.8.9 Περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (*gpx1*)

Η περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (*Gpx1*) είναι ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O). Η *Gpx1* είναι ένα τετραμερές ένζυμο και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (Lubos et al. 2011).

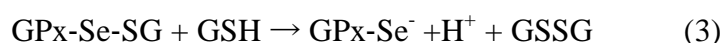
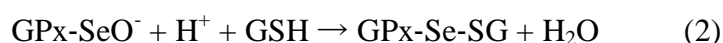


Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης Gpx1

(Brigelius-Flohé & Maiorino 2013)

Η Gpx1 είναι μία σεληνοπρωτεΐνη με μία σεληνοκυστεΐνη (Sec) στο ενεργό της κέντρο. Η αναγωγή του H_2O_2 ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων σε νερό πραγματοποιείται με την κατανάλωση γλουταθειόνης (GSH) ως αναγωγικό παράγοντα (Brigelius-Flohé & Maiorino 2013).

Η αντίδραση που πραγματοποιεί η Gpx1 είναι η εξής:



1.8.10 Αναγωγή της γλουταθειόνης (*gsr*)

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα οξειδοαναγωγής των περισσότερων αερόβιων οργανισμών. Η ανηγμένη του μορφή (GSH) λειτουργεί ως πυρηνόφιλο με σκοπό τη μετατροπή ηλεκτρονιόφιλων ουσιών κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες (Deronte 2013).

Η GR είναι μία φλαβοπρωτεΐνη. Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:



Καθώς η GR μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή (GSSG) της γλουταθειόνης στην ανηγμένη (GSH), βοηθά στη διατήρηση υψηλών επιπέδων ανηγμένης

γλουταθειόνης (Kamerbeek et al. 2007). Η GSH αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων βοηθώντας στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης.

1.8.11 Τρανσφεράση α2 της γλουταθειόνης (*gsta-2*)

Οι GSTs (Glutathione S-Transferases) είναι μία μεγάλη κατηγορία ενζύμων υπεύθυνων για την αποτοξικοποίηση ενδογενών ενώσεων και εξωγενών χημικών, όπως φαρμακευτικά προϊόντα και περιβαλλοντικοί ρύποι (Hayes et al. 2005).

Ο ρόλος των GSTs είναι να αποτοξικοποιεί ηλεκτρόφιλα μόρια με τη σύνδεση με GSH. Με αυτό τον τρόπο, μειώνει την πιθανότητα αλληλεπιδράσεων αυτών των μορίων με κυτταρικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. (Josephy 2010).

Οι α-GSTs ανήκουν στις κυτταροπλασματικές τρανσφεράσες (Oakley 2011). Καθώς οι α-GSTs τείνουν να σχηματίζουν ετεροδιμερή, ένας μεγάλος αριθμός ισοενζύμων μπορεί να σχηματιστεί. Οι α-GSTs είναι μία μεγάλη κατηγορία τρανσφερασών στο ήπαρ, με την GSTa2 να εμφανίζει μεγάλο πολυμορφισμό (Hayes et al. 2005).

Πέρα από τη σύζευξη με GSH, οι GSTs συμμετέχουν στη βιοσύνθεση ορμονών, αποκοδόμηση της τυροσίνης, αποικοδόμηση υπεροξειδίων κ.ά. (Hayes et al. 2005).

2. Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η ανάλυση της επίδρασης εκχυλισμάτων πράσινου και καβουρδισμένου καφέ (*Coffea arabica*) στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων στόχων του Nrf2 σε μυοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα σε συγκεντρώσεις που βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών.

3. Μεθοδολογία

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).

3.2 Ετοιμασία εκχυλισμάτων καφέ

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από 2 δείγματα καφέ:

- 1) Brazil Green (άψητος)
- 2) Brazil Roasted (3.52min, 215°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 καλλιεργούνταν σε 75cm² 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% CO₂. 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 θρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην θρυψίνη 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 Απομόνωση ολικού RNA και μετατροπή σε cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τις 2 κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια εμπορικών kit. Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει λύση κυττάρων με τη χρήση lysis buffer-μερκαπτοαιθανόλης, κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση αιθανόλης, κατακράτηση νουκλεϊκών οξέων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη και προσθήκη νερού για συλλογή RNA και DNA. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην συλλογή τόσο RNA όσο και DNA λόγω του αρνητικού τους φορτίου.

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

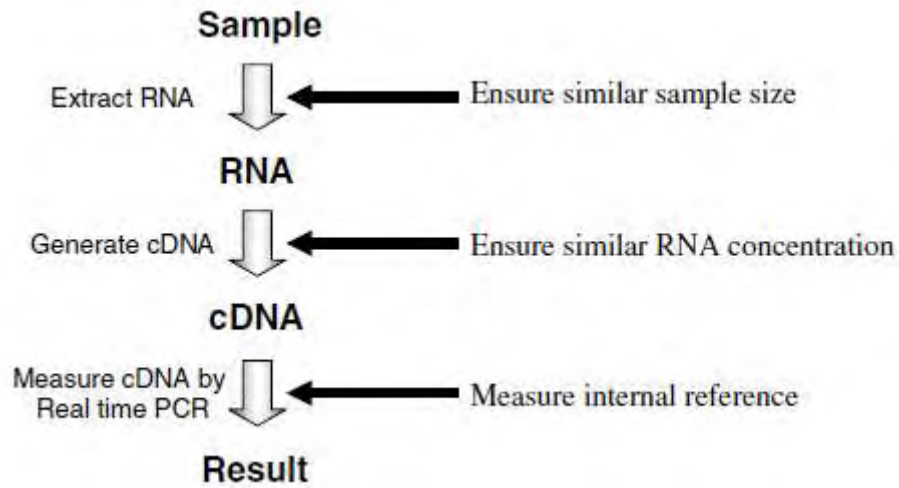
3.5 Real-time PCR

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

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

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

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της real-time PCR περιλαμβάνει κανονικοποίηση. Η κανονικοποίηση ως προς ένα γονίδιο αναφοράς είναι μία απλή μέθοδος για τον έλεγχο εσωτερικών σφαλμάτων της real-time PCR. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς ένα housekeeping γονίδιο (γονίδιο αναφοράς). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου αποτελεί το GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης). Η έκφραση αυτών των γονιδίων βρίσκεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς και παραμένει ανεπηρέαστη από εξωτερικούς παράγοντες (Huggett et al. 2005).

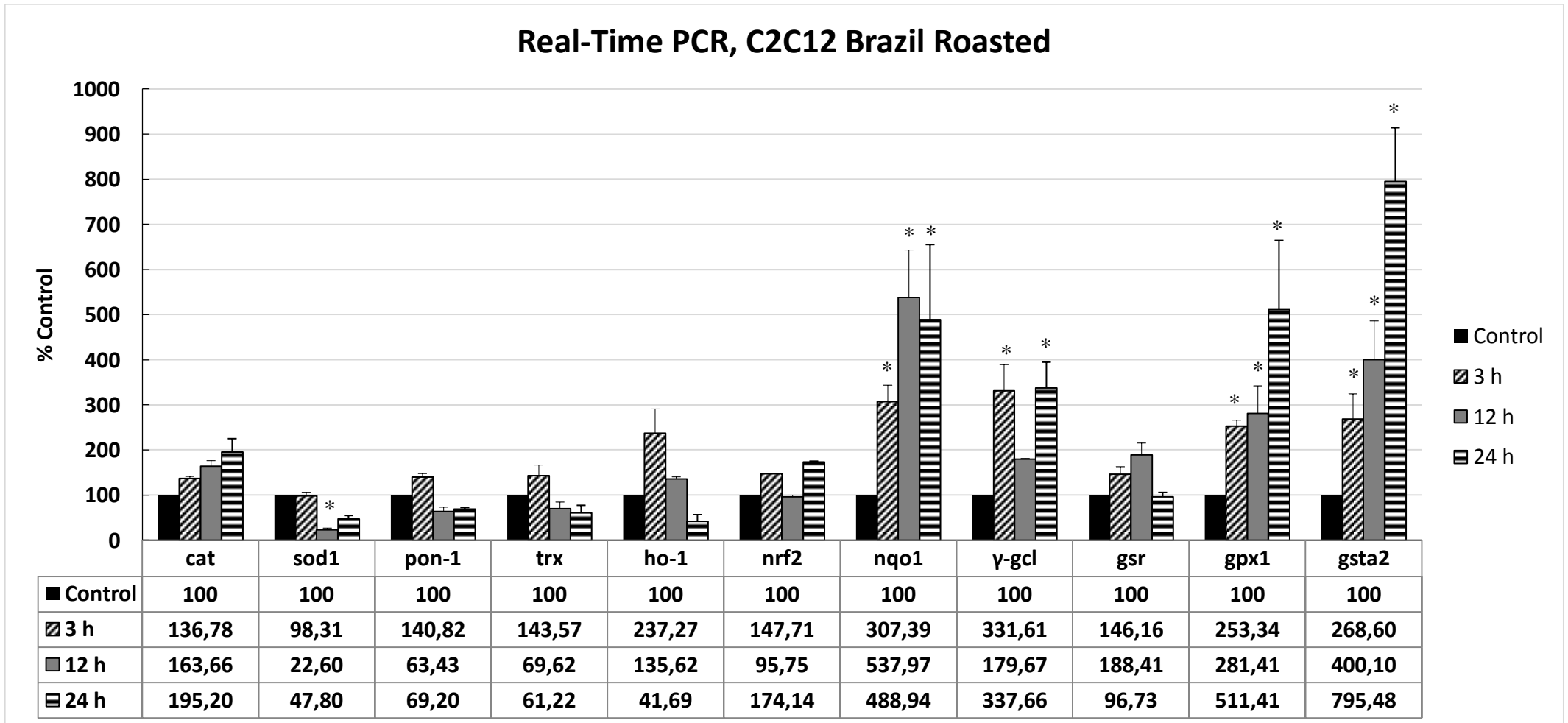


Εικόνα 20: Συνολική διαδικασία πειράματος

(Huggett et al. 2005)

Η συνολική διαδικασία αποτυπώνεται στην παραπάνω εικόνα. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η απομόνωση του ολικού RNA του κυττάρου. Το mRNA στη συνέχεια μετατρέπεται σε cDNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολουθεί η real-time PCR.

4. Αποτελέσματα



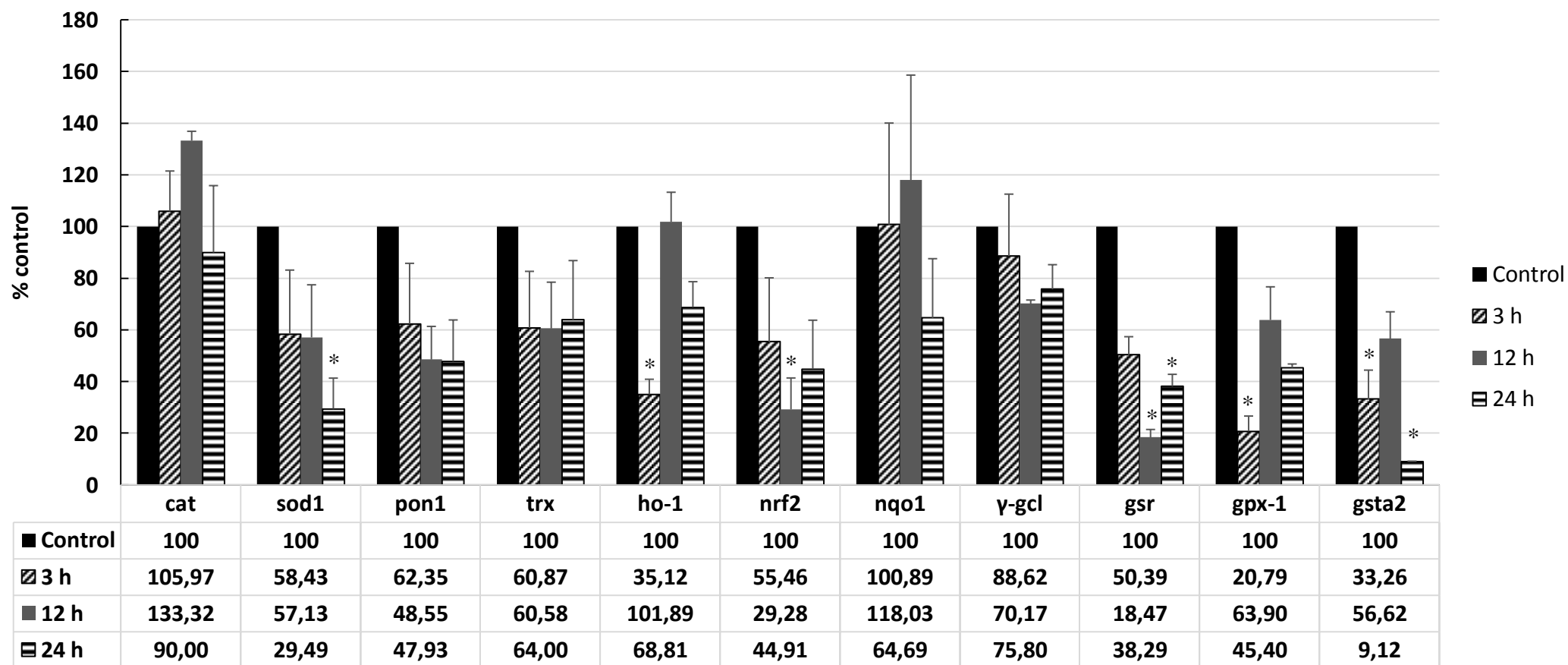
Διάγραμμα 1: Επίδραση καφέ (Brazil Roasted) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στην κυτταρική σειρά C2C12.

Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης 11 γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος καφέ σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η έκφραση έχει κανονικοποιηθεί ως προς τα κύτταρα-control με γονίδιο κανονικοποίησης το *gapdh*. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$.

Η έκφραση του γονιδίου *sod1* μειώνεται σημαντικά στις 12h κατά 78% σε σχέση με το control. Η έκφραση του *nqo1* παρουσιάζει αύξηση κατά 207%, 437% και 388% στις 3h, 12h και 24h αντίστοιχα. Σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση του παρουσιάζει και το γονίδιο *γ-gcl*, τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται κατά 231% στις 3h και 237% στις 24h. Ανοδική τάση εμφανίζουν τα επίπεδα του *gpx1* με αύξηση 153% στις 3h, 181% στις 12h και 411% σε σχέση με το control. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το γονίδιο *gsta2*, με την αύξηση να αγγίζει το 168% στις 3h, 300% στις 12h και 695% στις 24h.

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνται στα επίπεδα των *cat*, *pon1*, *trx*, *ho-1*, *nrf2* και *gsr*. Ωστόσο, ανοδική τάση παρατηρούμε στα επίπεδα των *cat*, *nrf2* και *gsr*. Αντίθετη εικόνα παρουσιάζουν τα γονίδια *pon1* και *trx*, με τα επίπεδα τους να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου. Η έκφραση του *ho-1* αρχικά εμφανίζει μία αύξηση, ενώ μειώνεται στο time point των 24h.

Real-Time PCR, C2C12, Brazil Green

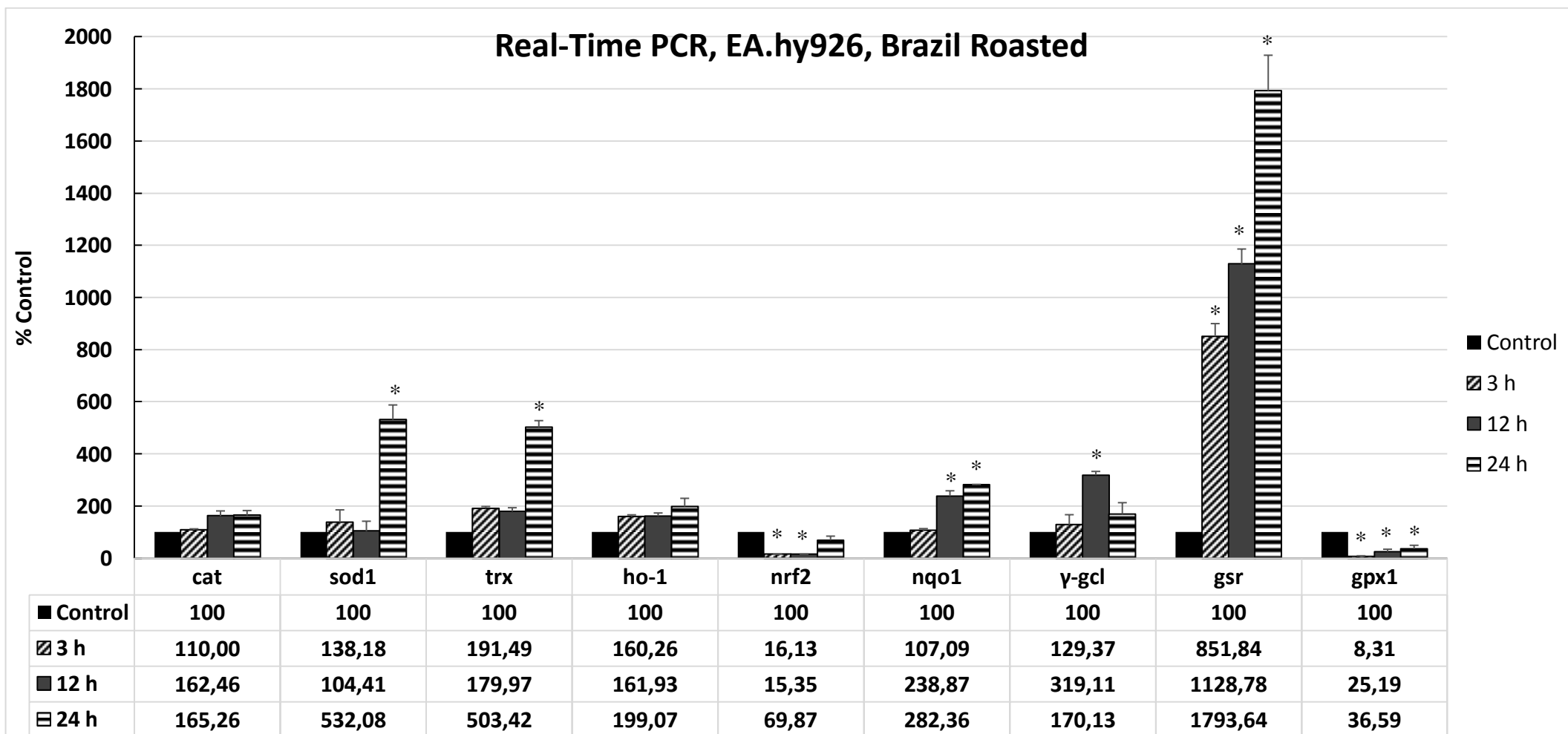


Διάγραμμα 2: Επίδραση καφέ (Brazil Green) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στην κυτταρική σειρά C2C12.

Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης 11 γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος καφέ σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η έκφραση έχει κανονικοποιηθεί ως προς τα κύτταρα-control με γονίδιο κανονικοποίησης το *gapdh*. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$.

Σημαντική πτώση της τάξης του 71% παρατηρείται στην έκφραση του γονιδίου *sod1* στις 24h σε σχέση με το control. Πτώση εμφανίζει και η έκφραση του *ho-1* στις 3h κατά 65%. Ανάλογη εικόνα παρατηρείται και στον *nrf2* με την πτώση στις 12h να αγγίζει το 71%. Τα επίπεδα του γονιδίου *gsr* μειώνονται κατά 82% στις 12h και κατά 62% στις 24h. Μείωση στην έκφραση της εμφανίζει και το *gpx1* στις 3h της τάξης του 80%. Πτώση εμφανίζουν και τα επίπεδα του γονιδίου *gsta2* κατά 67% στις 3h και κατά 91% στις 24h.

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται στα επίπεδα έκφρασης των *cat*, *pon1*, *trx*, *nqo1* και *γ-gcl*. Πτωτική πορεία εμφανίζουν τα επίπεδα έκφρασης των *pon1*, *trx* και *γ-gcl*. Η έκφραση των *cat* και *nrf2* έχει κοινά στοιχεία, με τα επίπεδα τους να είναι ανεβασμένα στην αρχή και με την πάροδο του χρόνου να μειώνονται σε σχέση με το control.



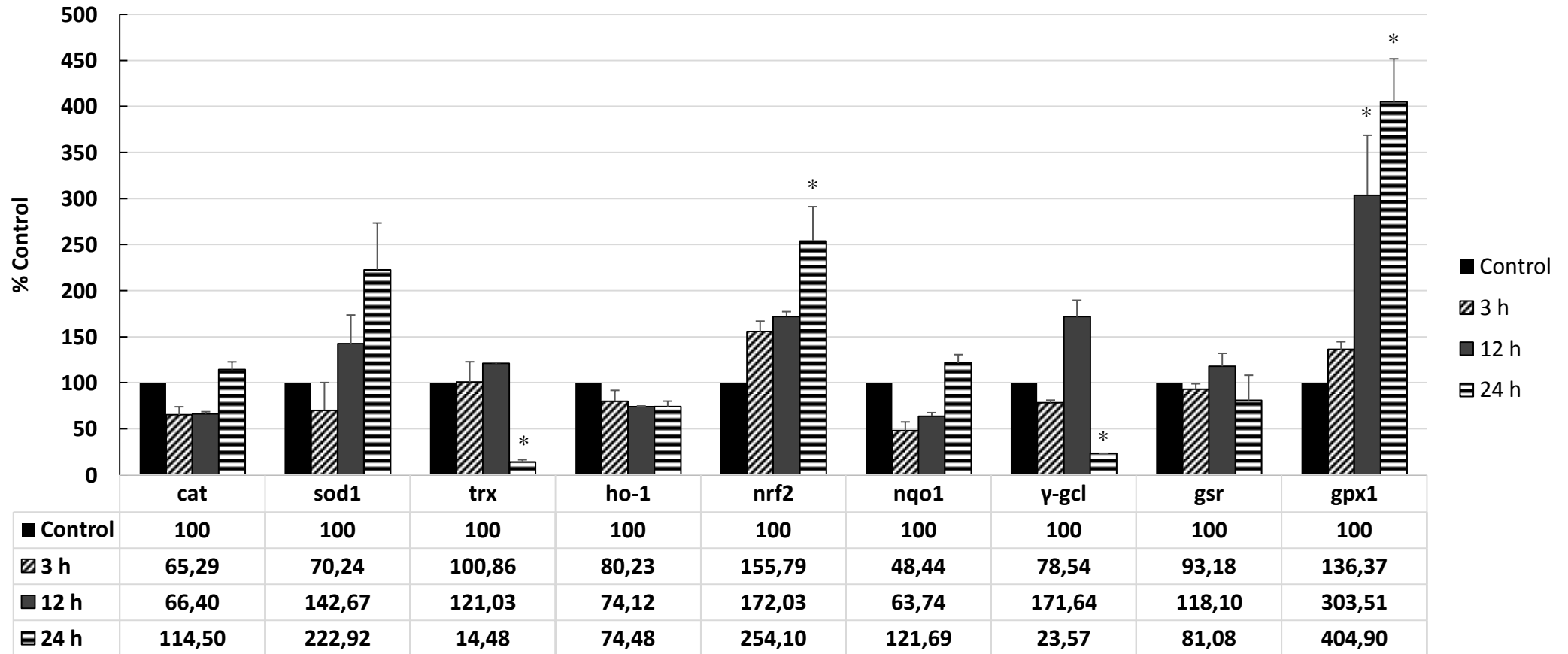
Διάγραμμα 3: Επίδραση καφέ (Brazil Roasted) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στην κυτταρική σειρά EA.hy926.

Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης 9 γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος καφέ σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η έκφραση έχει κανονικοποιηθεί ως προς τα κύτταρα-control με γονίδιο κανονικοποίησης το *gapdh*. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$.

Αύξηση εμφανίζει η έκφραση του γονιδίου *sod1* στις 24h της τάξης του 432%. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το *trx*, η έκφραση του οποίου αυξάνεται στις 24h κατά 403%. Πτωτική πορεία έχουν τα επίπεδα του *nrf2* με την μείωση να αγγίζει το 84% στις 12h και το 85% στις 24h σε σχέση με το control. Αντίθετη εικόνα εμφανίζει το *nqo1* με αύξηση στην έκφραση των 12h και 24h κατά 138% και 182% αντίστοιχα. Αύξηση παρουσιάζει και η έκφραση του γονιδίου *γ-gcl* στις 12h κατά 219%. Σημαντικές διαφορές παρουσιάζουν και το *gsr* και το *gpx1*. Αυξητική πορεία εμφανίζουν τα επίπεδα έκφρασης του *gsr* με την αύξηση να αγγίζει το 751%, 1028% και 1693% στις 3h, 12h και 24h αντίστοιχα. Αντίθετα, πτώση παρατηρείται στο *gpx1* της τάξης του 92% στις 3h, 75% στις 12h και 64% στις 24h.

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται στα επίπεδα έκφρασης των *cat* και *ho-1*. Ωστόσο, και στα 2 γονίδια μπορούμε να παρατηρήσουμε μία ανοδική πορεία στην έκφραση τους σε σχέση με το control.

Real-Time PCR, EA.hy926, Brazil Green



Διάγραμμα 4: Επίδραση καφέ (Brazil Green) στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στην κυτταρική σειρά EA.hy926.

Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης 9 γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος καφέ σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η έκφραση έχει κανονικοποιηθεί ως προς τα κύτταρα-control με γονίδιο κανονικοποίησης το *gapdh*. Τα αστεράκια υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control με στάθμη σημαντικότητας $p < 0,05$.

Η έκφραση του γονιδίου *trx* μειώνεται στο time point των 24h κατά 86%. Αντίθετα, αύξηση παρατηρείται στην έκφραση του *nrf2* στις 24h κατά 154%. Πτώση εμφανίζει η *γ-gcl* στις 24h κατά 77%. Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται στην έκφραση του γονιδίου *gpx1* στις 12h και 24h κατά 203% και 304% αντίστοιχα.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνται στα επίπεδα έκφρασης των *cat*, *sod1*, *ho-1*, *nqo1* και *gsr*. Τα επίπεδα των *cat*, *ho-1* και *gsr* παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζουν αισθητές διαφορές σε σχέση με το control. Τα επίπεδα έκφρασης του *sod1* αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου, ενώ η έκφραση του *nqo1* αρχικά μειώνεται, ενώ μετέπειτα αυξάνεται και ξεπερνά αυτή του control χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικώς σημαντική η διαφορά τους.

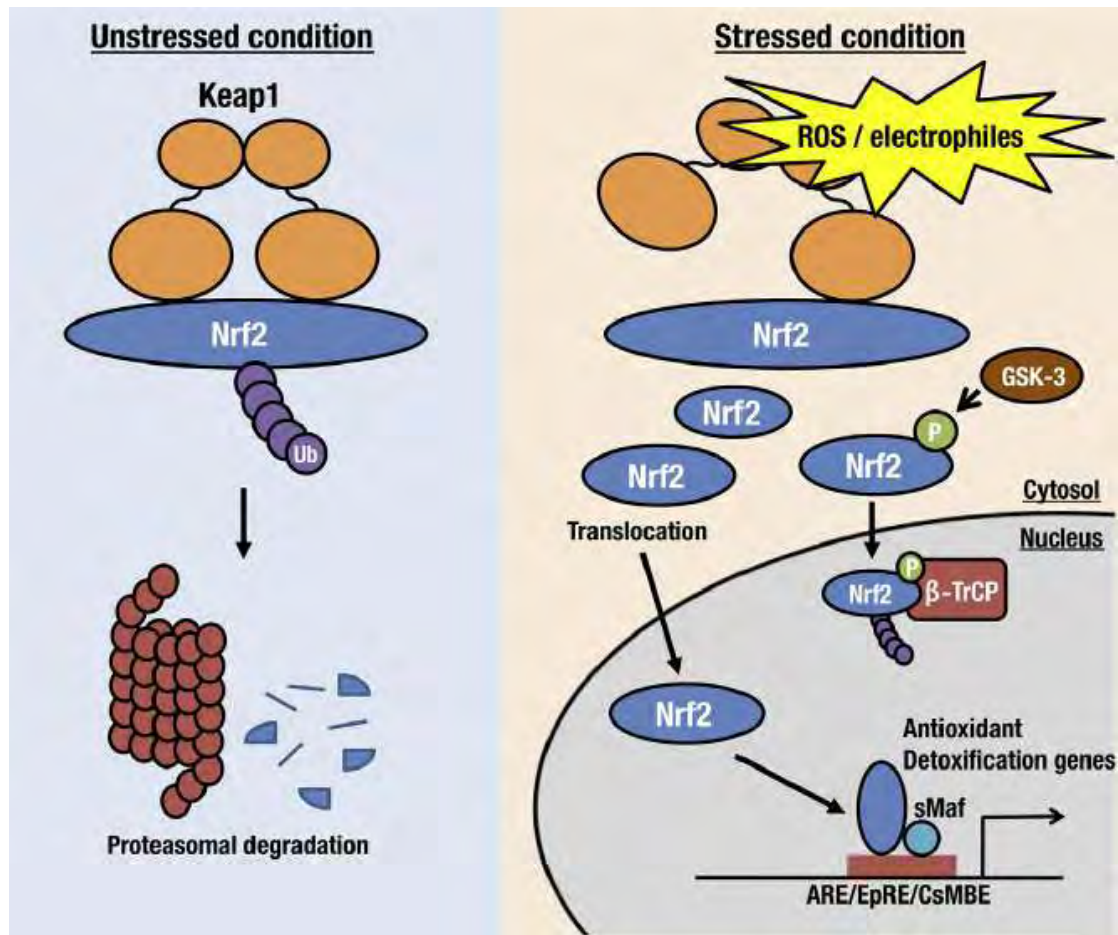
5. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία χορηγήθηκαν εκχυλίσματα καφέ σε κυτταρικές σειρές με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση που έχουν στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών γονιδίων. Πρόκειται για τη συνέχιση προηγούμενης εργασίας κατά την οποία χορηγήθηκαν εκχυλίσματα καφέ στις ίδιες κυτταρικές σειρές (μυοβλάστες ποντικού C2C12 και ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου EA.hy926) ώστε να φανεί η επίδραση τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων.

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα φάνηκε πως τα εκχυλίσματα καφέ αύξησαν τα επίπεδα γλουταθειόνης χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορές τόσο μεταξύ των καβουρδισμένων και πράσινων εκχυλισμάτων όσο και μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Αναλυτικότερα, στους μυοβλάστες και τα δύο εκχυλίσματα οδήγησαν σε παρεμφερή αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης περίπου κατά 65-70%. Ωστόσο, λόγω ισχυρότερης κυτταροτοξικότητας του πράσινου εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκε πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε αυτό και συγκεκριμένα χορηγήθηκαν 400μg καβουρδισμένου καφέ ανά ml θρεπτικού και μόλις 2,5μg πράσινου καφέ. Στα ενδοθηλιακά παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης της τάξης του 20-25%. Ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα τόσο καβουρδισμένου όσο και πράσινου καφέ (100μg/ml).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις (που προκαλούν τη μέγιστη αύξηση GSH) ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 έπειτα από επώαση σε 3 συγκεκριμένα time points (3h, 12h, 24h).

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2 είναι ένας βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός στην άμυνα του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες και εμπλέκεται σε πλήθος ασθενειών. Ένας τρόπος αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες, που προκαλείται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), είναι μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα nuclear factor erythroid 2- related factor 2 ή Nrf2 (Cheng et al. 2016).



Εικόνα 21: Μηχανισμός ρύθμισης Nrf2 (Suzuki et al. 2016)

Η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) λειτουργεί ως «αισθητήρας στρες». Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται από το σύμπλοκο Keap1-Cullin3 ubiquitin E3 λιγάση στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες ή τοξικά ξеноβιοτικά, η αποικοδόμηση του Nrf2 σταματά, ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα, ο Nrf2 σχηματίζει διμερή με τις μικρές Maf πρωτεΐνες και επάγει την έκφραση γονιδίων-στόχων (Suzuki et al. 2016).

Η Keap1 διαθέτει πολλά κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys) τα οποία λειτουργούν ως αισθητήρες στρες. Οι Cys περιέχουν θειόλες (-SH) οι οποίες αντιδρούν με ηλεκτρονιόφιλα μόρια. Πολλά χημικά που δρουν ως ενεργοποιητές του Nrf2 αντιδρούν με αυτά τα κατάλοιπα κυστεϊνης (Suzuki et al. 2016). Ακόμα, υπάρχουν και εναλλακτικοί τρόποι ρύθμισης του Nrf2 όπως για παράδειγμα η ουβικιτινιλύωση έπειτα από φωσφορυλίωση από την GSK-3 που οδηγεί σε αναγνώριση από την β-TrCP (που με τη σειρά της συνδέεται σε μια E3 λιγάση ουβικιτίνης).

Μέσα στον πυρήνα, τα διμερή Nrf2-sMaf αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA γνωστές ως ARE (antioxidant response element) ή EpRE (electrophile response element). Ο Nrf2 επάγει την έκφραση γονιδίων υπεύθυνα για αποτοξικοποίηση, όπως NQO-1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1), GSTs (glutathione S-transferases), Gclc (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) και Gclm (glutamate-cysteine ligase modifier subunit), καθώς και απομάκρυνση των ROS όπως HO-1 (heme oxygenase 1) and Prdx1 (Peroxyredoxin 1) (Suzuki et al. 2016).

Με βάση τα αποτελέσματα των μυοβλαστών, παρατηρήθηκε ότι ο καβουρδισμένος καφές οδήγησε σε αύξηση έκφρασης σχεδόν όλων των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλουταθειόνης (gcl, gpx1, gsta2) σχεδόν σε όλες τις χρονικές στιγμές. Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης με την πάροδο του χρόνου με μοναδική εξαίρεση την gsr, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control. Κατ' αυτό τον τρόπο, μπορεί να δικαιολογηθεί η μεγάλη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης του προηγούμενου πειράματος λόγω αυξημένης βιοσύνθεσης και ανακύκλωσης της συγκεκριμένης θειόλης. Αξιοσημείωτη αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της nqo1, η οποία υπερεκφράστηκε 5 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα (base line). Στο γονίδιο sod1 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης με την πάροδο του χρόνου. Συνολικά, η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων υποδεικνύει ότι η επώαση με καφέ οδήγησε στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Σύμφωνα με την ανάλυση σύστασης του καφέ, είναι πλούσιος στο μόριο 5-καφεοϋλοκινικό οξύ (5-CQA), το οποίο είναι γνωστός ενεργοποιητής του Nrf2, καθώς αλληλεπιδρά με Cys της KEAP1, οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου της με τον μεταγραφικό παράγοντα. Στα γονίδια όπου παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση, μία υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι ότι οφείλεται σε λόγους κυτταρικής οικονομίας, καθώς είχαν ήδη αυξηθεί οι υπόλοιποι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί (μεταβολισμός GSH, nqo1, cat).

Όσον αφορά τον πράσινο καφέ, η χορήγηση του στους μυοβλάστες οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το εκχύλισμα καφέ θα μπορούσε να μειώσει την έκφραση γονιδίων δεν είναι γνωστός, ωστόσο μπορεί να γίνει μία υπόθεση. Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν διαφορετικό τρόπο δράσης ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Αναλυτικότερα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρουν απευθείας ως αντιοξειδωτικά εξουδετερώνοντας οι ίδιες τις ελεύθερες ρίζες, ενώ πάνω από μία ουδό συγκέντρωσης

εμφανίζουν προ-οξειδωτικά φαινόμενα, καθώς μετατρέπονται οι ίδιες σε ρίζες (κινόνες) και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις Cys της KEAP1 οδηγώντας σε ενεργοποίηση του Nrf2. Έτσι ενώ στην περίπτωση του καβουρδισμένου καφέ έχουμε πιθανότατα ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα, στον πράσινο (που σημειωτέον χρησιμοποιήθηκε 160 φορές χαμηλότερη ποσότητα καφέ) τα βιοδραστικά μόρια έδρασαν απευθείας ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες κι αυτό οδήγησε σε “εφησυχασμό” του κυττάρου που για λόγους κυτταρικής οικονομίας μείωσε τα επίπεδα έκφρασης. Συμπερασματικά, τα δυο εκχυλίσματα καφέ είχαν το ίδιο μεν αποτέλεσμα ως προς τα επίπεδα γλουταθειόνης (αύξηση ~70%), αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών (γονιδιακή έκφραση στον καβουρδισμένο, “sparing” στον πράσινο).

Όσον αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο ψημένος καφές οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων με μόνες εξαιρέσεις τον *nrf2* και την *gpx1*. Ως προς τον μεταβολισμό της GSH, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA της λιγάσης της γάμμα-γλουτάμυλοκυστεΐνης έως και κατά 3.2 φορές ενώ μεγάλη και μάλιστα χρονοεξαρτώμενη αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, φτάνοντας 18 φορές τα επίπεδα έκφρασης του control. Η παρατηρούμενη αύξηση σε αυτά τα δύο γονίδια σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα της περοξειδάσης της γλουταθειόνης μπορεί να εξηγήσει την αύξηση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν κατέστη δυνατό να πάρουμε αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Πέραν αυτών, αυξημένα επίπεδα έκφρασης είχαμε και σε όλα τα υπόλοιπα γονίδια, με το *sod1* και το *trx* να εκφράζονται 5 φορές πάνω από το control και τα επίπεδα του *hsp1* να είναι αυξημένα έως και 1.6, 2 και 2.8 φορές σε σχέση με το control. Εξαίρεση αποτέλεσε ο *nrf2* τα επίπεδα έκφρασης του οποίου μειώθηκαν έως και κατά 85% σε σχέση με το control ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για το γονίδιο της παραοξονάσης. Συνολικά υπάρχει η ένδειξη πως ο καφές οδήγησε στην αύξηση έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων μέσω του μονοπατιού KEAP1-Nrf2 χωρίς όμως να παρατηρηθεί θετικό feedback από το ARE στον υποκινητή του ίδιου του Nrf2.

Ο πράσινος καφές δεν προκάλεσε μείωση στα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων, όπως στην περίπτωση των μυοβλαστών, κάτι που οφείλεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε. Αναλυτικότερα, προκλήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της *gpx1* (4 φορές μεγαλύτερη στις 24h) και του *nrf2*

(έως και 2,5 φορές μεγαλύτερη στις 24h). Στα υπόλοιπα γονίδια παρατηρήθηκε είτε μικρή πτώση στα επίπεδα έκφρασης τους είτε παρέμειναν σταθερά. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση του *γ-gcl*, τα επίπεδα έκφρασης του οποίου στις 24 ώρες ήταν στο 23.6% του control σημειώνοντας πτώση κατά 86% σε σχέση με το προηγούμενο time point. Η συγκεκριμένη παροδική αύξηση ίσως μπορεί να δικαιολογήσει εν μέρει την αύξηση στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης σε προηγούμενο πείραμα, παρόλο που τα επίπεδα της αναγωγάσης παραμένουν σταθερά και αυτά της περοξειδάσης αυξάνονται αρκετά.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση αντιοξειδωτικών γονιδίων μετά από χορήγηση καφέ σε κύτταρα ή ανθρώπους (Boettler, Volz, et al. 2011; Boettler, Sommerfeld, et al. 2011; Hoelzl et al. 2010). Αναλυτικότερα, μελέτη βασίστηκε σε 36 υγιείς εθελοντές, μισοί από τους οποίους κατανάλωσαν καφέ και μισοί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα control. Μέσω real-time PCR, παρατηρήθηκε αύξηση αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως *nqo-1*, *sod1*, *gsta2*, *nrf2* κ.ά.. Παρόλο που καμία αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική, δείχνουν μία τάση προς ένα πρότυπο έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (Hoelzl et al. 2010). Άλλη μελέτη πάνω σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (κύτταρα HT29) υπέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως *ho-1*, *nrf2*, *γ-gcl* μετά από επώαση με εκχυλίσματα καφέ (Boettler, Sommerfeld, et al. 2011).

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναφέρονται σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό πως τα επίπεδα mRNA δεν ταυτίζονται πάντα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη καθώς η γονιδιακή έκφραση είναι μια διαδικασία που υποβάλλεται σε πολλαπλά στάδια ελέγχου σε όλες τις φάσεις της. Για παράδειγμα, τα mRNA μπορούν να οδηγηθούν σε αποικοδόμηση από miRNA προτού φτάσουν στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τοιουτοτρόπως, για να επιβεβαιωθεί η επίδραση του καφέ στην γονιδιακή έκφραση κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση πρωτεωμικής μελέτης και ανάλυσης δραστηριότητας.

Ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία της συγκεκριμένης πτυχιακής, πέραν του πιθανού μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ ήταν η αναγνώριση πιθανών γονιδίων δεικτών της επίδρασης του καφέ αναλόγως της δόσης (πχ η αναγωγάση της γλουταθειόνης που αυξήθηκε 18 φορές). Αυτά μακροπρόθεσμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες *in vivo* ούτως ώστε να παρακολουθείται η επίδραση που

έχει το ρόφημα τόσο στην έκφραση γονιδίων όσο και στη συνολική οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού.

6. Βιβλιογραφία

- Atia, A., Alrawaiq, N. & Abdullah, A., 2014. A review of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1); A multifunctional antioxidant enzyme. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(12), pp.118–122.
- Boettler, U., Sommerfeld, K., et al., 2011. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(5), pp.426–440.
- Boettler, U., Volz, N., et al., 2011. Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(5), pp.798–802.
- Brigelius-Flohé, R. & Maiorino, M., 2013. Review: Glutathione peroxidases. *Cellular functions of glutathione*, 1830(5), pp.3289–3303.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), pp.192–208.
- Cheng, D. et al., 2016. Regulation of Keap1–Nrf2 signaling: The role of epigenetics. *Current Opinion in Toxicology*, 1, pp.134–138.
- Collet, J.-F. & Messens, J., 2010. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(8), pp.1205–1216.
- Costa, L.G. et al., 2005. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta*, 352(1–2), pp.37–47.
- D'Archivio, M. et al., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), pp.1321–1342.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), pp.3217–3266.
- Elias S. J. ArneÂr and Arne Holmgren, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem*, 6109, pp.6102–6109.
- Franklin, C.C. et al., 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular aspects of medicine*, 30(1–2), pp.86–98.
- 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.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. & Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), pp.51–88.
- Hoelzl, C. et al., 2010. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(12), pp.1722–1733.
- Holmgren, A., 1989. Electron Transport to Reductive Enzymes. *Biochemistry*, 264(24), pp.13963–13966.
- Huggett, J. et al., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), pp.279–284.
- Itoh, K. et al., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes*

- and Development*, 13(1), pp.76–86.
- Josephy, P.D., 2010. Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology. *Human Genomics and Proteomics*, 2010, pp.1–14.
- Kamerbeek, N.M. et al., 2007. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. , 109(8), pp.3560–3566.
- Karlenius, T.C. & Tonissen, K.F., 2010. Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, 2(2), pp.209–232.
- Kikuchi, G., Yoshida, T. & Noguchi, M., 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), pp.558–567.
- Krinsky, N.I., 2002. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of nutrition*, 132(3), p.540S–542S.
- Liang, N. & Kitts, D.D., 2015. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), pp.1–20.
- Litvinov, D., Mahini, H. & Garelnabi, M., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: Implication in arteriosclerosis diseases. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(11), pp.523–532.
- Lubos, E., Loscalzo, J. & Handy, D.E., 2011. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), pp.1957–1997.
- Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, pp.401–426.
- Mackness, B., Durrington, P.N. & Mackness, M.I., 1998. Human Serum Paraoxonase. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(3), pp.329–336.
- Meng, S. et al., 2013. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, p.801457.
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H. & Yamamoto, M., 2012. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology*, 2(December), pp.1–13.
- Moreira, A.S.P. et al., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), pp.903–915. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C2FO30048F>.
- Morse, D. & Choi, A.M.K., 2005. Heme oxygenase-1: From bench to bedside. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(6), pp.660–670.
- Nguyen, S.D. & Sok, D.-E., 2003. Oxidative Inactivation of Paraoxonase1, an Antioxidant Protein and its Effect on Antioxidant Action. *Free Radical Research*, 37(12), pp.1319–1330.
- Nordberg, J. & Arner, E.S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine*, 31(11), pp.1287–1312.
- Oakley, A., 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), pp.138–151.
- 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., 2011. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, p.194586.
- Ponchel, F. et al., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 3, p.18.
- Putnam, C.D. et al., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), pp.295–309.
- 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. Oxidativestressinaginghumanskin. *Biomolecules*, 5(2), pp.545–589.
- Ryter, S.W., Alam, J. & Choi, A.M.K., 2006. Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev*, 86, pp.583–650.
- Schieber, M. & Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), pp.R453–R462. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
- Sea, K. et al., 2015. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), pp.2405–2418.
- Suzuki, M. et al., 2016. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Current Opinion in Toxicology*, 1, pp.29–36.
- 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.
- 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. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> [Accessed July 9, 2014].
- Valko, M. et al., 2006. Freeradicals, metalsandantioxidantsinoxidativestress-inducedcancer. *Chemico-biologicalinteractions*, 160(1), pp.1–40.
- Παπαγαλάνης, Ν., 2014. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I. Δραστικές ρίζες οξυγόνου. , 26(3), pp.151–194.