



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
M.Sc. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Διπλωματική Εργασία με θέμα

Έκφραση γονίδιων στόχων του Nrf2 σε ιστούς αρουραίων μετά από χορήγηση εκχυλίσματος καφέ.

Expression of Nrf2 target genes in rat tissues after administration of coffee extract.

Μάκιου Ανθή – Στυλιανή

Λάρισα, 2019



Μέλη τριμελούς επιτροπής

- **Κουρέτας Δημήτριος**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας
- **Στάγκος Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών
- **Αμούτζιας Γρηγόριος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική

Στοιχεία πτυχιακής εργασίας

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Τοξικολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριου.

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερώς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική εργασία μου στο εργαστήριο του. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επίκουρο καθηγητή Δημήτριο Στάγκο για την βοήθεια του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν για μια ακόμη φορά και τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για τη βοήθειά του στις πειραματικές διαδικασίες, την αισιοδοξία και το χιούμορ του με τα οποία αντιμετωπίσαμε όποιες δυσκολίες παρουσιάστηκαν.

Περιεχόμενα

Μέλη τριμελούς επιτροπής.....	2
Στοιχεία πτυχιακής εργασίας.....	3
Ευχαριστίες	3
Σκοπός.....	7
Περίληψη.....	7
Abstract	8
A) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ & ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Οι ελεύθερες ρίζες.....	9
1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	10
1.3 Το οξειδωτικό στρες.....	11
1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	12
1.5 Αντιοξειδωτικά & αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
B) Ο ΚΑΦΕΣ, ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ.....	16
1. Ο καφές	16
2. Πολυφαινόλες.....	17
Γ) ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ	19
1. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (nrf-2)	19
2. Καταλάση (cat).....	20
3. Υπεροξειδική δισμουτάση (<i>sod1</i>)	20
4. Λιγάση της γ-γλουτάμυλοκυστεΐνης (γ-GCL)	20
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	22
A) ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	22
1.1 Χορήγηση καφέ σε αρουραίους και συλλογή ιστών.....	22
1.2 Επεξεργασία & ομογενοποίηση ιστών	22

2. Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης	23
2.1 Γενικά.....	23
2.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	23
2.3 Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης	24
2.4 Ικανότητα διάσπασης H ₂ O ₂	25
2.5 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)	25
2.6 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	26
2.7 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	27
3. Western-blot για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ-GCL, SOD-1 και CAT	28
4. Real-time PCR (sod1, gclc, cat).....	29
4.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA.....	29
4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων	30
5. Στατιστική ανάλυση	31
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
A. Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς.....	32
B. Real-time PCR (sod1, gclc, cat)	37
Γ. Western-blot Analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ-GCL, SOD-1 και CAT	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
Βιβλιογραφία.....	45

Κατάλογος Εικόνων

<i>Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)</i>	10
<i>Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια</i>	10
<i>Εικόνα 3: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ROS.....</i>	11
<i>Εικόνα 4: Συγκέντρωση ROS και οξειδωτικό στρες</i>	12
<i>Εικόνα 5: Θετικές και αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου.....</i>	13
<i>Εικόνα 6: Ποσοστιαία σύσταση των πράσινων και των καβουρδισμένων κόκκων του καφέ.....</i>	17
<i>Εικόνα 7: Δομές των χλωρογενικών οξέων του καφέ.....</i>	19
<i>Εικόνα 8: Μηχανισμός ρύθμισης Nrf2</i>	20
<i>Εικόνα 9: Αντιδράσεις παραγωγής GSH</i>	21
<i>Εικόνα 10: Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης.....</i>	23
<i>Εικόνα 11: Συντακτικός τύπος GSH.....</i>	24
<i>Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής western blot.....</i>	29
<i>Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ.....</i>	42

Σκοπός

Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στην μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του καφέ σε επτά ιστούς (εγκέφαλος, πνεύμονας, νεφρός, σπλήνας, πάγκρεας, καρδιά, τετρακέφαλος) επίμυων. Αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκε ώστε να εκτιμηθεί η αντιστοιχία των *in vivo* με προγενέστερα *in vitro* αποτελέσματα, καθώς και για τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ.

Περίληψη

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

Abstract

Coffee is one of the most famous and widely consumed beverages worldwide due to its unique flavor and aroma. This beverage is made from roasted coffee seeds, deriving from the *Coffea sp* plant. Being a plant product, coffee contains a variety of potentially bioactive compounds (e.g. caffeine and polyphenols). Coffee's worldwide popularity has attracted the scientific interest of many researchers and as a result there have been conducted several studies that investigate its human health benefits. Contradicting results have been reported by these studies, but there is a lack of information regarding coffee's molecular mechanism of action. Therefore, this study investigates the impact of coffee consumption in rat redox status in some of their tissues, as well as the molecular mechanisms behind this effect (mRNA levels, protein levels). The results led to the conclusion that coffee did improve the redox status in rats' tissues. At a molecular level there was reported a significant increase in transcription and translation of the γ -Glutamylcysteine ligase (γ - GCL) enzyme which catalyzes the first and rate-limiting step in the glutathione biosynthetic pathway.

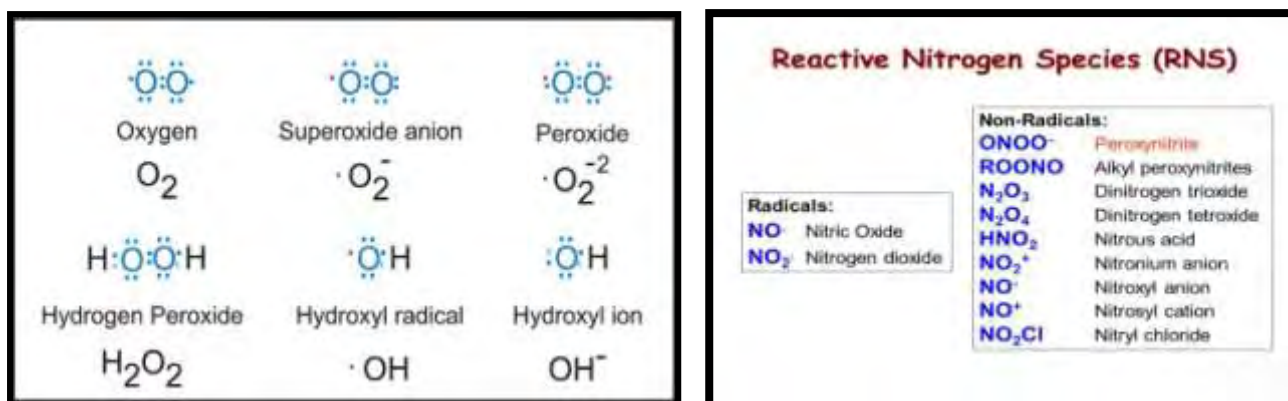
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ & ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1 Οι ελεύθερες ρίζες

Για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ή ένα άτομο ως ελεύθερη ρίζα, αρκεί να υπάρχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους, κάτι που συμβαίνει με την προσθήκη ή την απώλεια ενός ηλεκτρονίου (1). Οι ελεύθερες ρίζες λόγω της αστάθειάς τους έχουν τη δυνατότητα να αντιδρούν με άλλα μόρια, να τα οξειδώνουν και συνεπώς να επηρεάζουν φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. οξείδωση DNA, οξείδωση λιπιδίων κ.α).

Πρόκειται για μία ετερογενής ομάδα μορίων, με την απλούστερη να είναι το άτομο υδρογόνου. Υπάρχουν διάφορα είδη ελευθέρων ριζών ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο. Για παράδειγμα, εάν το κεντρικό άτομο είναι το οξυγόνο, κάνουμε λόγο για «Δραστικές μορφές οξυγόνου» (Reactive Oxygen Species, ROS), ενώ αν είναι το άζωτο, τότε έχουμε «Δραστικές μορφές αζώτου» (Reactive Nitrogen Species, RNS) (2). Οι ROS, οι οποίες είναι και οι βασικότερες, περιλαμβάνουν τις ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}) και τις μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδους οξέος ($HOCl$), υποβρωμιώδους οξέος ($HOBr$), όζοντος (O_3) και μονήρους οξυγόνου (1O_2).



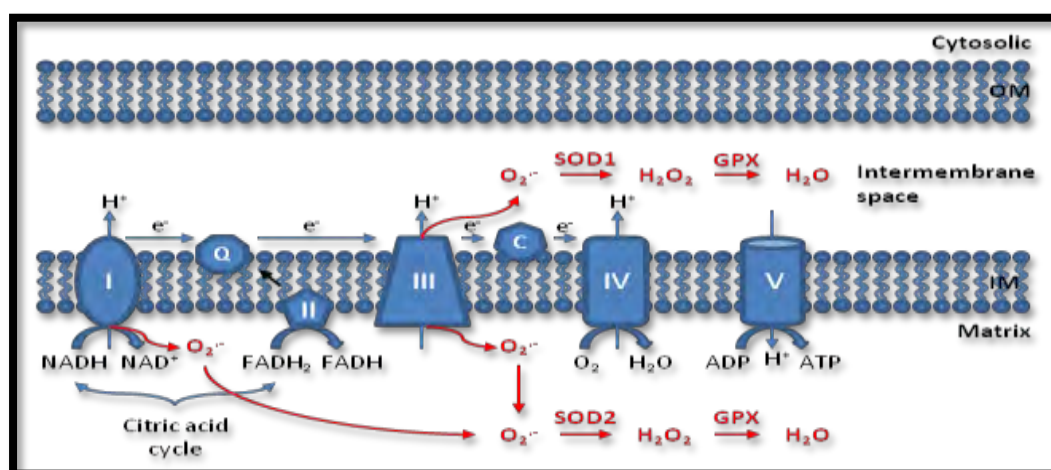
Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μέσω δυο οδών: της ενδογενούς και της εξωγενούς.

▪ Ενδογενείς Πηγές:

Η βασική ενδογενής πηγή των ελευθέρων ριζών δεν είναι άλλη από τα μιτοχόνδρια, όπου πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση (αναπνευστική αλυσίδα). Στην όλη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων συμμετέχει το κυτόχρωμα c, το NADH/FADH και η ουβικινόνη, με τελικό αποδέκτη το O_2 και κατ' επέκταση την αναγωγή του σε H_2O . Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι κατά τη διαδικασία αναγωγής ένα μικρό ποσοστό μπορεί να μετατραπεί σε $^1\text{O}_2$ ή $\text{O}_2^{\cdot-}$.

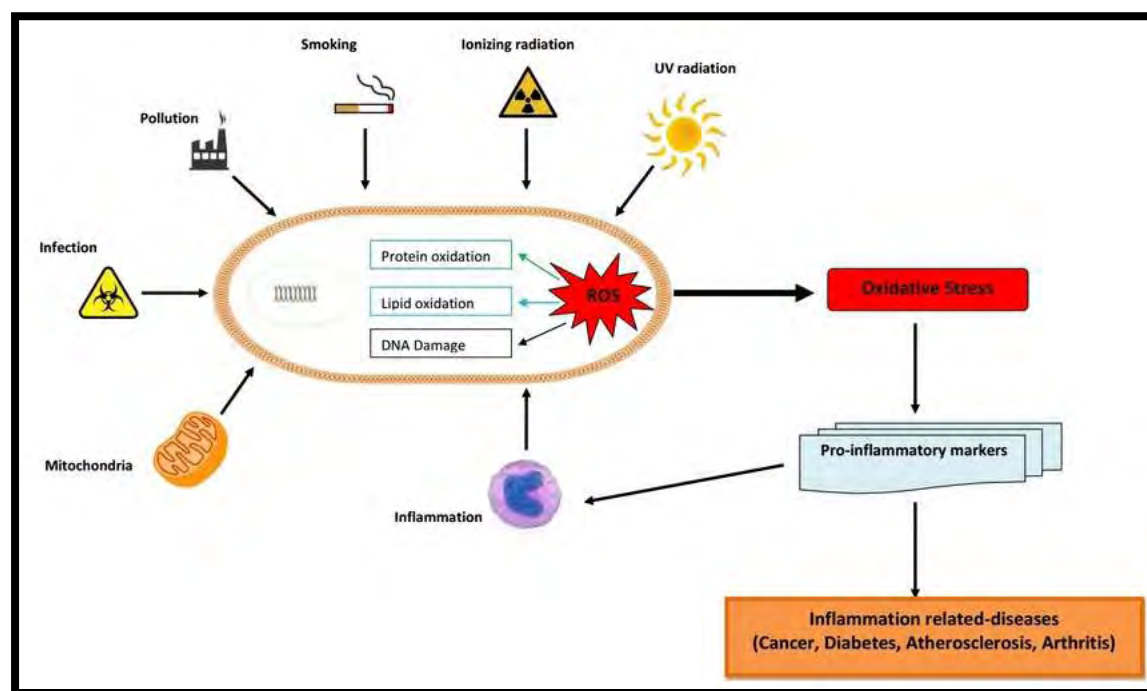


Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Το O_2 , επίσης, υφίσταται μεταβολές από διάφορα ένζυμα (πχ οι οξειδάσες P450, η κυκλοξυγενάση και η οξειδάση της ξανθίνης) που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τέλος, και το ανοσοποιητικό μας σύστημα δύναται να παράγει ελεύθερες ρίζες με σκοπό να αντιμετωπίσει ποικίλες βλάβες λόγω εισόδου παθογόνων σε αυτό.

▪ Εξωγενείς Πηγές:

Όσον αφορά τις εξωγενείς πηγές, αυτές μπορεί να είναι: η ρύπανση της ατμόσφαιρας, ο καπνός του τσιγάρου, το όζον, διάφορα φάρμακα και ξενοβιοτικές ουσίες, διάφορα εντομοκτόνα, η υπερϊώδης ακτινοβολία, τα βιομηχανικά απόβλητα, αλλά και η κατανάλωση αλκοόλ, όπως επίσης και οι διατροφικές συνήθειες του καθενός (3).

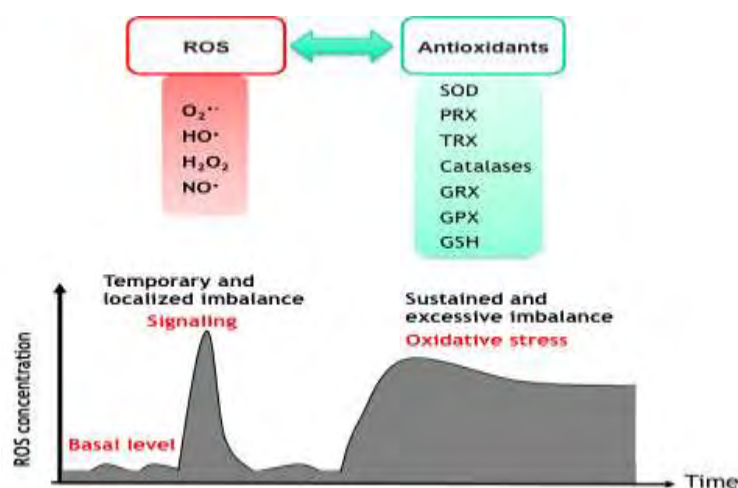


Εικόνα 3: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ROS

1.3 Το οξειδωτικό στρες

Τα βιολογικά συστήματα είναι απαραίτητο να διατηρούν μια ισορροπία ανάμεσα στον σχηματισμό και στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών. Αυτό, ωστόσο, δεν συμβαίνει πάντοτε, με αποτέλεσμα όταν η παραγωγή ριζών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που θα μπορούσαν να εξουδετερώσουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού μας (π.χ. λόγω ύπαρξης διαφόρων παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους) ή όταν μειώνεται για κάποιο λόγο η δράση των αντιοξειδωτικών

μηχανισμών (π.χ. λόγω μεταλλάξεων ή δράσης τοξικών παραγόντων), να παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες. (4). Η παροδική κατάσταση του οξειδωτικού στρες θεωρείται ως κάτι φυσιολογικό που συμβαίνει στον οργανισμό, εντούτοις όταν η κατάσταση αυτή παρατείνεται οι συνέπειες που αυτό επιφέρει είναι πολλές με κυριότερες τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές των κυττάρων, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα στο μονοπάτι της απόπτωσης ή της νέκρωσης.



Εικόνα 4: Συγκέντρωση ROS και οξειδωτικό στρες

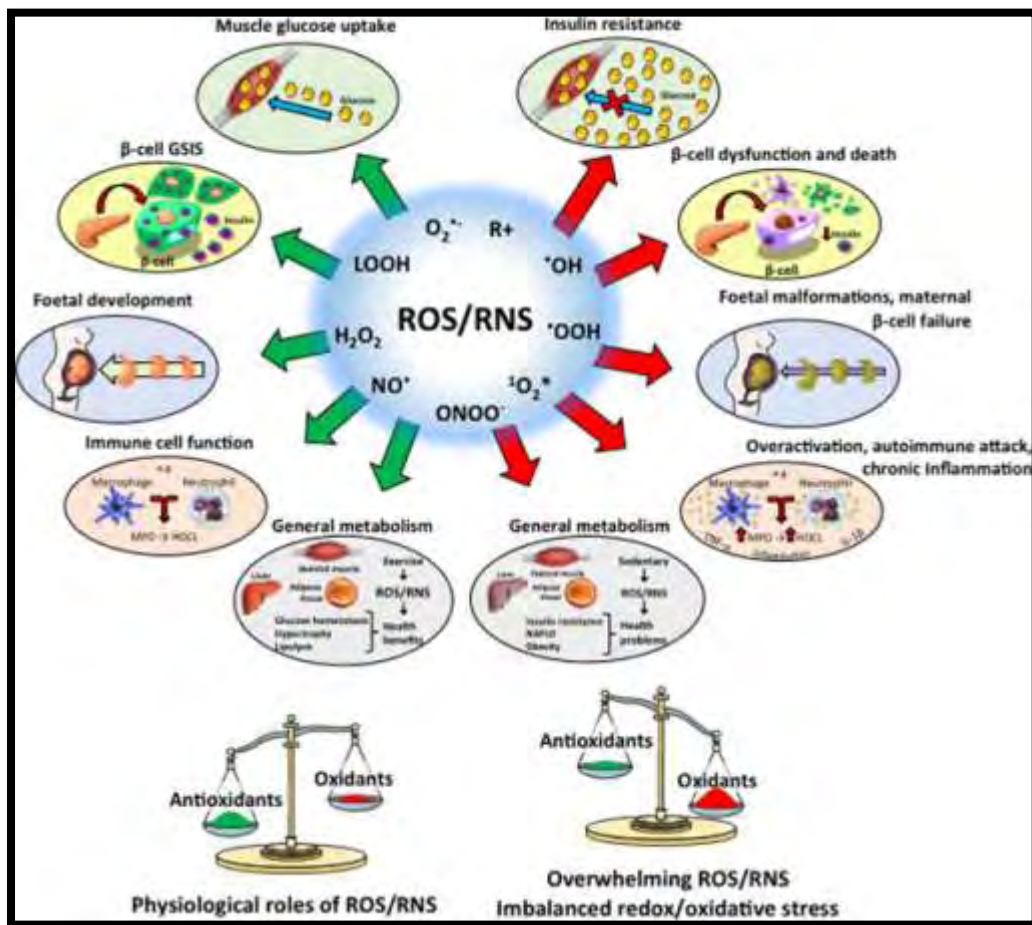
1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

1.4.1 Θετικές επιδράσεις

Φυσιολογικά οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν μέρος σε διάφορες διαδικασίες του οργανισμού. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις φλεγμονής, οι ROS διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (5,6). Επιπλέον, μπορεί να λειτουργούν και ως σηματοδοτικά μόρια σε λειτουργίες όπως η διακυτταρική επικοινωνία, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μυϊκή συστολή και η έκφραση γονιδίων (7). Όσον αφορά την απώλεια μυϊκής συστολής και τη μυϊκή κόπωση, αυτές οι καταστάσεις προκύπτουν αντίστοιχα από την αναστολή ή την αυξημένη παραγωγή ROS. Είναι αναγκαίο λοιπόν να ρυθμίζουμε τη διατροφή μας με τέτοιον τρόπο ώστε να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία και γι' αυτό η κατανάλωση αντιοξειδωτικών θα πρέπει να γίνεται στηριζόμενοι στις εκάστοτε ανάγκες του οργανισμού (8).

1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί στενά με την εμφάνιση αρνητικών επιπτώσεων στον οργανισμό. Η υπέρμετρη παραγωγή τους σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μυϊκή καταστροφή και την κόπωση (9). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι προκαλούν οξείδωση βιομορίων (DNA, λιπιδίων, μεμβρανών, πρωτεϊνών). Τέλος, έχει βρεθεί και συσχέτισή τους με κάποιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των Parkinson, Alzheimer, κατάθλιψης και γήρανσης (3).



Εικόνα 5: Θετικές και αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου

1.5 Αντιοξειδωτικά & αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.5.1 Ορισμός

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού» (10). Υπάρχουν τόσο αντιοξειδωτικά ένζυμα όσο και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία έχουν τη

δυνατότητα να εμποδίσουν τη δημιουργία ριζών, να τις αδρανοποιήσουν (δημιουργία λιγότερο δραστικών μορίων), αλλά και να βοηθήσουν στην επιδιόρθωση βλαβών που αυτές προκαλούν.

1.5.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται μόρια, τα οποία δεν παράγονται από τον οργανισμό μας αλλά τα προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: οι βιταμίνες C και E, το β-καροτένιο και η ουβικινόνη, μεταξύ άλλων.

▪ **Βιταμίνες C & E**

Η μια (βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ) είναι υδατοδιαλυτή, ενώ η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή. Και οι δυο ωστόσο, λειτουργούν ως εξωγενή αντιοξειδωτικά, με τη βιταμίνη C να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS, και τη βιταμίνη E να προστατεύει τις μεμβράνες (κυτταροπλασματική και μιτοχονδριακή) από οξείδωση (3).

▪ **B-καροτένιο**

Πρόκειται για ένα λιποδιαλυτό μόριο, το οποίο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και πιστεύεται πως έχει τη δυνατότητα να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες περιορίζοντας έτσι την λιπιδική οξείδωση. Αλληλεπιδρά με τις προαναφερθείσες βιταμίνες ενώ ταυτόχρονα ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα (3).

▪ **Ουβικινόνη**

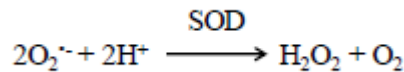
Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ως φορέας ηλεκτρονίων. Η αντιοξειδωτική της δράση είναι μεγάλης σημασίας ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι βοηθάει και στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (3).

1.5.3 Ενδογενή αντιοξειδωτικά – Ενζυμικοί & μη-ενζυμικοί μηχανισμοί

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), αλλά και μη ενζυμικά μόρια όπως η γλουταθειόνη και το ουρικό οξύ.

- **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

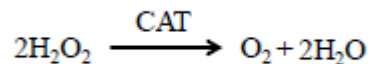
Πρόκειται για ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την μετατροπή της ρίζας του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Όπως αναφέρθηκε, το σουπεροξείδιο είναι παραπροϊόν της αναπνευστικής αλυσίδας και μπορεί να αναχθεί από τη SOD (μιτοχονδριακή / κυτταροπλασματική, ανάλογα τον εντοπισμό του).

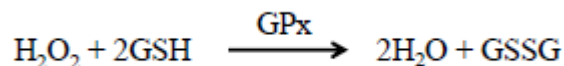
- **Καταλάση (CAT)**

Τα υπεροξειδιοσώματα βοηθούν την αποτοξίνωση των κυττάρων με τη χρήση O_2 και την παραγωγή H_2O_2 . Σε αυτά, εντοπίζεται το ένζυμο καταλάση, το οποίο συμμετέχει σε όλη την διαδικασία και είναι ο καταλύτης αυτής της αντίδρασης, όπως ακριβώς παρουσιάζεται παρακάτω, δρώντας όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι υψηλή (11).



- **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**

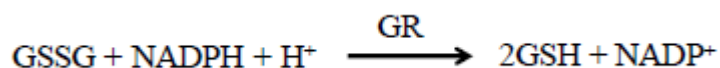
Οι περιοχές εντοπισμού του ενζύμου είναι τα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και ο εξωκυττάριος χώρος. Καταλύει την ίδια αντίδραση με την καταλάση, με χρήση της ανηγμένης γλουταθειόνης, η οποία και οξειδώνεται (12). Συγκριτικά με την καταλάση, η GPx ενεργοποιείται και από χαμηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 .



- **Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)**

Για τη διατήρηση της GSH/GSSG σε φυσιολογικά επίπεδα, είναι απαραίτητη η συμμετοχή της GR, η οποία μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης στην αντίστοιχη ανηγμένη. Η GR έχει ως συμπάραγοντα το φλαβινο-αδενινουκλεοτίδιο (FAD). Το FAD ανάγεται από το φωσφορυλιωμένο νικοτιναμιδο-

αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADPH) και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στη δισουλφιδική γέφυρα, μέσω της οποίας ενώνονται 2 μόρια GSSG. Με τον τρόπο αυτό, σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH (13).



▪ Ουρικό οξύ

Στο μονοπάτι μεταβολισμού των πουρινών τελικό προϊόν είναι το ουρικό οξύ. Αυτό παίζει σημαντικό ρόλο έναντι των ROS καθώς έχει αντιοξειδωτική δράση. Έχει παρατηρηθεί πως τα επίπεδά του στο αίμα αυξάνονται κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης (14).

▪ Γλουταθειόνη

Πρόκειται για το σημαντικότερο, ίσως, ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο, το οποίο είναι υδατοδιαλυτό και αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (15). Το σημαντικό πλεονέκτημα της γλουταθειόνης είναι η δυνατότητα ανακύκλωσής της από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη κατάσταση (στην οποία οφείλονται και οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες) και το αντίστροφο. Προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από οξειδωτική βλάβη (16).

B) Ο ΚΑΦΕΣ, ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ

1. Ο καφές

Ο καφές είναι ίσως το πιο δημοφιλές ρόφημα, που παρασκευάζεται από τους σπόρους της καφέας ή καφεόδεντρου (*Coffea sp.*). Η αναζωογονητική του δράση οφείλεται στο κύριο συστατικό του, την καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές το οποίο εντοπίζεται στους σπόρους των καρπών του. Εξαιτίας των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών και της γεύσης του, αποτελεί καθημερινή συνήθεια για εκατοντάδες εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο (17). Σύμφωνα με ιστορικά δεδομένα, ο καφές φαίνεται πως ξεκίνησε από την Αιθιοπία, όπου ο καρπός χρησιμοποιούνταν από τους γηγενείς είτε αυτούσιος είτε αλεσμένος. Το όνομά του προέρχεται από την αραβική λέξη قهوة (*qahwa*), η οποία αναφερόταν ετυμολογικά σε κάποιο είδος κρασιού. Φαίνεται, λοιπόν, πως ο καφές χρησιμοποιήθηκε ως υποκατάστατο του κρασιού, μιας και η θρησκεία τους απαγορεύει την κατανάλωση αλκοόλ.

Οι δύο ποικιλίες που καταναλώνονται περισσότερο παγκοσμίως είναι η *Coffea arabica* και η *Coffea canephora* (Robusta). Στη δεύτερη ποικιλία μάλιστα παρατηρείται σχεδόν διπλάσια ποσότητα καφεΐνης. Εξαιτίας της μαζικής κατανάλωσης καφέ, οι επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στο ρόφημα αυτό, θέλοντας να ερευνήσουν την επίδραση των συστατικών του στην υγεία του ανθρώπου.

Προκειμένου κάποιος να καταναλώσει το ρόφημα είναι απαραίτητο το καβούρδισμα των κόκκων του, οι οποίοι όταν συλλέγονται είναι πράσινοι και παρουσιάζουν διαφορές στη σύστασή τους σε σχέση με τους ψημένους που προκύπτουν μετά από θέρμανση (17). Αυτές οι διαφορές είναι οι παρακάτω:

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

Εικόνα 6: Ποσοστιαία σύσταση των πράσινων και των καβουρδισμένων κόκκων του καφέ

2. Πολυφαινόλες

Πρόκειται για φυτοχημικές ουσίες (φυτικοί μεταβολίτες) οι οποίες εντοπίζονται στα φυτά και στα φυτικά τρόφιμα. Είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (πχ υπεριώδης ακτινοβολία, μικροβιακές εισβολές), ενισχύοντας έτσι τη φυσική τους άμυνα (18). Αναλόγως της χημικής τους δομής μπορούν να διακριθούν στις κάτωθι κατηγορίες: α) Φλαβονοειδή, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες, κατεχίνες), β) Φαινολικά οξέα και γ) Στιλβένια.

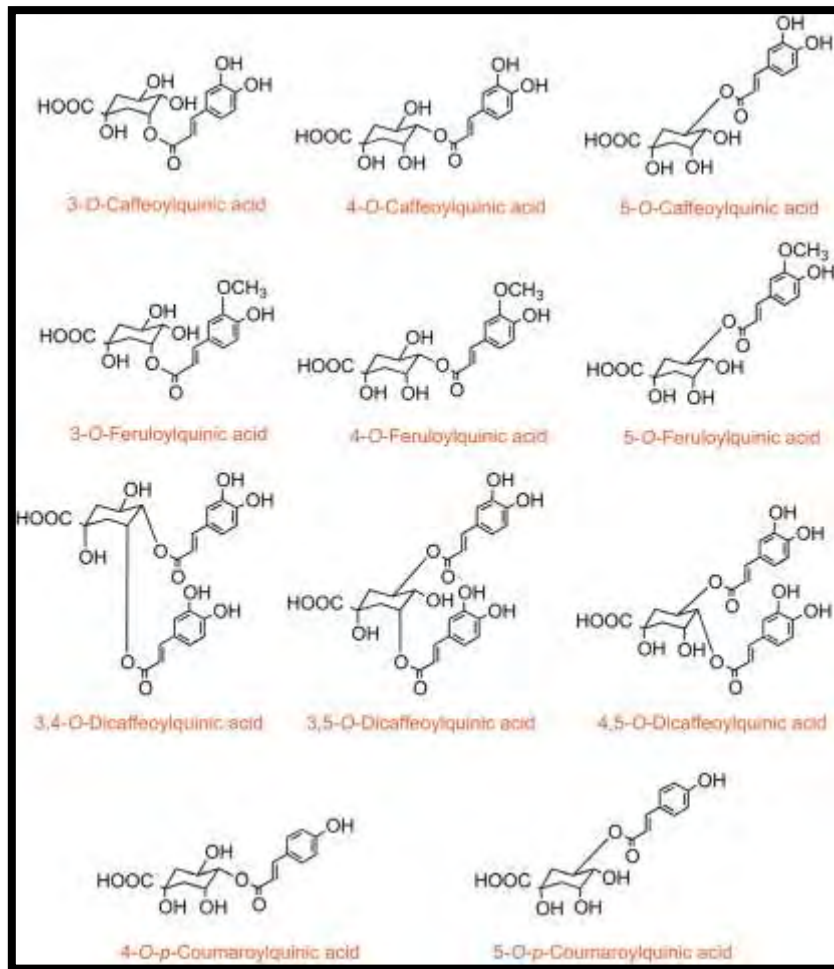
Η δομή τους ποικίλλει από μια απλή φαινολική ομάδα έως και πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους (19).

Τρόφιμα στα οποία εντοπίζονται μεγάλες ποσότητες πολυφαινόλων είναι μεταξύ άλλων τα φρούτα και τα λαχανικά, ο καφές, το τσάι, το κόκκινο κρασί και η σοκολάτα. Ακόμη, συναντούμε πολυφαινόλες στα βότανα και στα μπαχαρικά, στους ξηρούς καρπούς και στα φύκια (20). Για τη διατροφή του ανθρώπου είναι πολύ σημαντικά καθώς αποτελούν την αφθονότερη πηγή αντιοξειδωτικών.

Παρ' όλο που έχουν βρεθεί πολλές φαινολικές ενώσεις στα φυτά, θεωρείται ότι υπάρχουν και άλλα παράγωγά τους σε φρούτα και λαχανικά, τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη, ξεφεύγοντας των τεχνικών ανάλυσης.

Οι ευεργετικές ιδιότητες του καφέ, όπως αναφέρθηκε, οφείλονται στις διάφορες βιοδραστικές του ουσίες. Η σπουδαιότερη, ωστόσο, είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα, η οποία δεν σχετίζεται με την καφεΐνη, που είναι το πιο καλά μελετημένο συστατικό του. Αντιθέτως, φαίνεται ότι άλλες ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική του δράση (21). Αυτή, λοιπόν, έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει προστασία από διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος ή ο σακχαρώδης διαβήτης και γι' αυτό το λόγο ή κατανάλωση τέτοιων ενώσεων συνδέεται με ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία των ανθρώπων (21).

Η κύρια ομάδα πολυφαινόλων του καφέ είναι τα χλωρογενικά οξέα με σημαντικότερα τα 3 ισομερή του καφεϋλοκινικού οξέος (3-, 4-, 5- CQA). Η περιεκτικότητα ενός ροφήματος καφέ σε πολυφαινόλες επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο χρόνος καβουρδίσματος των κόκκων του καθώς και η διαδικασία παραγωγής του ροφήματος. Ακόμη, η απορρόφηση και ο μεταβολισμός των χλωρογενικών οξέων θα επηρεάσουν την τελική βιολογική τους δραστηριότητα. Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, τα χλωρογενικά οξέα έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν και αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση και φαίνεται, επίσης, ότι είναι σημαντικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπών στον οργανισμό (22,23).

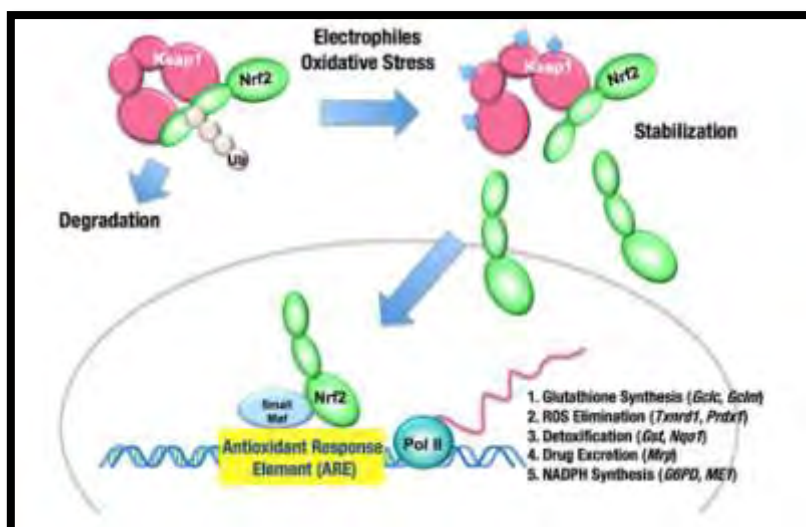


Εικόνα 7: Δομές των χλωρογενικών οξέων του καφέ

Γ) ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ

1. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (nrf-2)

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι μέλος της υποοικογένειας cap 'n' collar (CNC) της κατηγορίας μεταγραφικών παραγόντων leucine zipper (bZIP). Έχει καθοριστική σημασία στην έκφραση γονιδίων ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (24).



Εικόνα 8: Μηχανισμός ρύθμισης Nrf2

Η δραστηριότητα του Nrf2 εξαρτάται από την πρωτεΐνη Keap1. Σε φυσιολογικές συνθήκες μεσολαβείται η ουβικιτινίωση του Nrf2 από την Keap1, η οποία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Ωστόσο, η έκθεση σε ηλεκτρόφιλα (όπως οι ROS) έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης Keap1 λόγω οξείδωσης και την αναστολή του μονοπατιού που παρουσιάστηκε παραπάνω. Ο Nrf2 δεν αποικοδομείται, αλλά, αντιθέτως, μετατίθεται στον πυρήνα όπου επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για την αποφυγή κυτταρικών βλαβών (24).

Τα γονίδια-στόχοι του Nrf2 χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στοιχείων ARE (Antioxidant Response Elements) στους υποκινητές τους και εμπλέκονται μεταξύ άλλων στη βιοσύνθεση και μεταβολισμό της GSH, στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (24,25).

2. Καταλάση (cat)

Βλέπε [1.5.3](#)

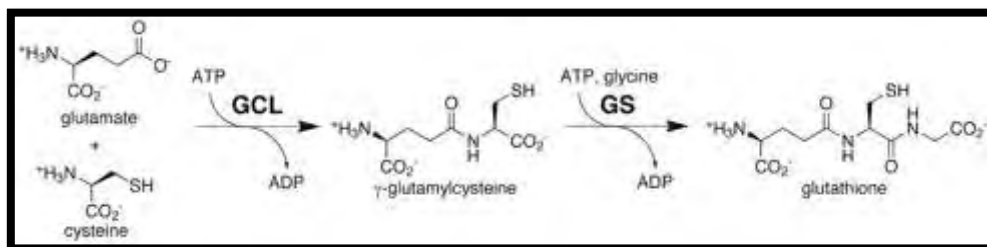
3. Υπεροξειδική δισμουτάση (sod1)

Βλέπε [1.5.3](#)

4. Λιγάση της γ-γλουτάμυλοκυστεΐνης (γ-GCL)

Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Το βιοσυνθετικό της μονοπάτι αποτελείται από δυο βήματα εκ των οποίων

το πρώτο και καθοριστικό καταλύεται από τη λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL), που αποτελείται από μια καταλυτική και μια ρυθμιστική υπομονάδα (26). Η σύνθεση της GSH ολοκληρώνεται όταν η GS (συνθετάση της γλουταθειόνης) προσθέτει μια γλυκίνη στη γ-GCL.



Εικόνα 9: Αντιδράσεις παραγωγής GSH

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A) ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Χορήγηση καφέ σε αρουραίους και συλλογή ιστών

Στο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήσαμε δώδεκα αρσενικούς αρουραίους Wistar, ηλικίας τριών μηνών. Επί 14 μέρες χορηγήσαμε εκχύλισμα καφέ στο νερό των αρουραίων (μια φορά την ημέρα) με δοσολογία 7,5 ml ανά Kg σωματικού (καθώς το εκχύλισμα αποτελείται από 10% v/w στερεά, η δόση αντιστοιχεί σε 750 mg καφέ ανά Kg σωματικού βάρους ανά ημέρα). Το εκχύλισμα καφέ που επιλέχθηκε για τη χορήγηση εμφάνισε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε προηγούμενες *in vitro* μελέτες (17,27–31). Η δοσολογία που επιλέξαμε προέκυψε τόσο από βιβλιογραφικές αναφορές, όσο και από τη δραστηριότητα που εμφάνισε το συγκεκριμένο εκχύλισμα στις *in vitro* τεχνικές (32).

Έπειτα, οι αρουραίοι θυσιάστηκαν, συλλέξαμε τους ιστούς και τους τοποθετήσαμε σε υγρό άζωτο για να διατηρηθούν. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φυσιολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Ταϊτζόγλου.

1.2 Επεξεργασία & ομογενοποίηση ιστών

Μετά τη συλλογή των ιστών των 12 αρουραίων, ξεκίνησε η πειραματική διαδικασία, στην οποία το πρώτο πράγμα που έλαβε χώρα ήταν η ομογενοποίηση των ιστών (εγκέφαλος, νεφρός, σπλήνας, πάγκρεας, πνεύμονας, καρδιά, τετρακέφαλος). Αρχικά, ζυγίστηκαν ~100 mg από τον κάθε ιστό σε σωληνάκια και εν συνεχεία προστέθηκε ποσότητα PBS (ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα 10% w/v) παρουσία μίγματος αναστολέων πρωτεασών (PMSF, 1 mM, EDTA 1 mM και leupeptin 0.1 mM). Η ομογενοποίηση πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε ειδικός ομογενοποιητής, ενώ στο δεύτερο στάδιο έγινε χρήση μηχανήματος υπερήχων. Τέλος, το ομογενοποίημα από κάθε ιστό μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάκια και φυγοκεντρήθηκε (5.000g, 5 min, 5°C). Συλλέχθηκε το

υπερκείμενο σε νέα erpendorfs και αυτά αποθηκεύτηκαν στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα μετρήσεις.

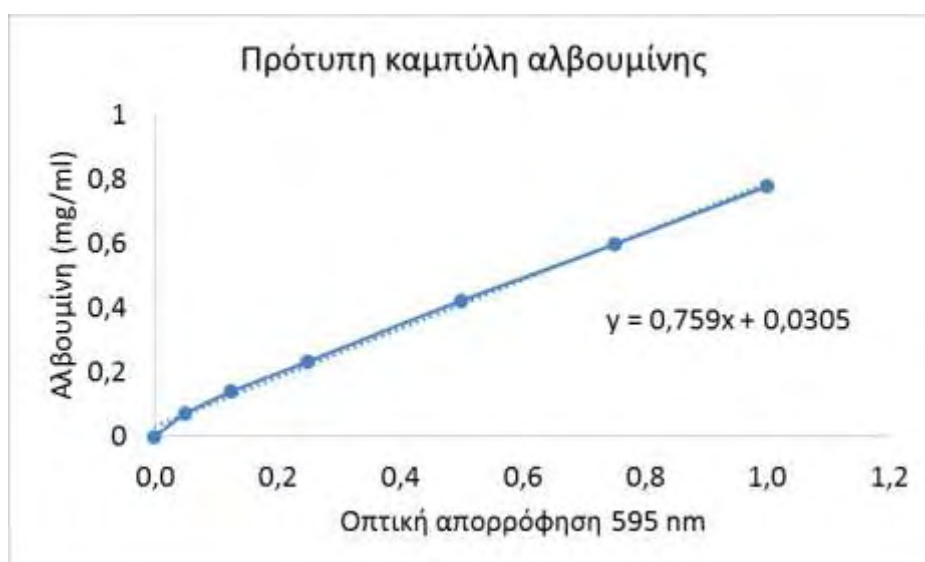
2. Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης

2.1 Γενικά

Για να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ικανότητα διάσπασης του H_2O_2 , και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Επιπροσθέτως, η αξιολόγηση της επίδρασης του καφέ στα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών των κυτταρικών μακρομορίων πραγματοποιήθηκε μέσω των τεχνικών TBARS και καρβονυλίων (CARB) για τη λιπιδική και πρωτεϊνική οξείδωση αντίστοιχα.

2.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

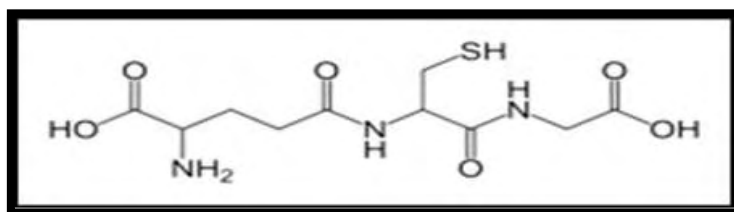
Για τον υπολογισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης με χρήση του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, παράγοντας προϊόν το οποίο έχει μπλε χρώμα και φωτομετρείται στα 595 nm.



Εικόνα 10: Πρότυπη Καμπύλη Αλβουμίνης

2.3 Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης

Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος, η ανηγμένη γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη ενδοκυτταρική θειόλη, φτάνοντας τα 15mM σε κάποιες περιπτώσεις. Οι αναγωγικές της ιδιότητες είναι καθοριστικές για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης των αερόβιων κυττάρων. Χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής κατάστασης, ενώ η αναλογία οξειδωμένης/ανηγμένης μορφής είναι: GSSG/GSH = 1/10 (15).



Εικόνα 11: Συντακτικός τύπος GSH

Μέθοδος:

Η GSH οξειδώνεται από το διθειόδου νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB), οδηγώντας στην παραγωγή ανηγμένης γλουταθειόνης και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος, το οποίο απορροφά στα 412 nm .

Πειραματική διαδικασία:

Εκατό μL ιστού αναμίχθηκαν με ισόποσο τριχλωροξικό οξύ (TCA) 5% και φυγοκεντρήθηκαν (15.000g, 5 min, 5°C). Το υπερκείμενο αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα και DTNB σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
PBS	20 μL	-
Ομογενοποιημένος Ιστός	-	20 μL

Τα αντιδραστήρια αναδεύτηκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 15 λεπτά (25°C). Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν (15.000g, 5 min, 5°C) και το περιεχόμενό τους φωτομετρήθηκε με χρήση πλαστικής κυψελίδας στα 412 nm .

2.4 Ικανότητα διάσπασης H₂O₂

Μέθοδος:

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκύπτει ως προϊόν μεταβολισμού. Λόγω της τοξικότητάς του είναι αναγκαία η γρήγορη μετατροπή του σε ουσία λιγότερο επικίνδυνη για τον οργανισμό. Ένζυμα όπως η καταλάση και οι περοξυρεδοξίνες, συμμετέχουν σε διαδικασίες μετατροπής του σε οξυγόνο και νερό (33).

Πειραματική διαδικασία:

Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, σύμφωνα με την υπόδειξη του πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑ	
Phosphatebuffer 67mM (pH 7.4)	3000 – ιστό μL
Ομογενοποιημένος Ιστός	4 – 40 μL

Αφού τα αναδεύσουμε για λίγα δευτερόλεπτα στο vortex, τα τοποθετούμε στον κλίβανο για επώαση (37°C / 10min). Μετά το πέρας της επώασης, μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε κυψελίδα χαλαζία, προσθέτοντας 5μL 30% H₂O₂, ανακινούμε και φωτομετρούμε στα 240 nm (UV) για 120 sec.

2.5 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

Η παρούσα τεχνική αποτιμά τη δυνατότητα των ιστών να εξουδετερώσουν ελεύθερες ρίζες. Αρκετά συστατικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, ωστόσο η συνεισφορά του καθενός είναι διαφορετική.

Μέθοδος:

Ο υπολογισμός της TAC γίνεται με χρήση του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), το οποίο παρουσία ενός δότη H⁺, ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης, η οποία έχει οπτική απορρόφηση στα 520 nm (34).

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Προσθήκη των παρακάτω ποσοτήτων σε σωληνάκια:

	ΤΥΦΛΟ	ΔΕΙΓΜΑ
Phosphate buffer 10mM, pH 7,4	480 μ L	480 μ L
DPPH 0,1mM	500 μ L	500 μ L
Ιστός	-	20 μ L
PBS	20 μ L	-

Αφού προσθέσουμε τα αντιδραστήρια, ανακινούμε τα eppendorfs και στη συνέχεια τα αφήνουμε για επώαση 45 λεπτών στο σκοτάδι. Έπειτα, φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 15000g στους 25°C. Σε πλαστική κυψελίδα μεταφέρουμε το περιεχόμενο και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm.

2.6 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Μέθοδος:

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να δημιουργήσει ασταθή υπεροξειδία λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Το προϊόν που προκύπτει μέσω αυτής της διάσπασης είναι η μηλονική διαλδεύδη, την οποία και έχουμε δυνατότητα να προσδιορίσουμε καθώς αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, σχηματίζοντας μια ένωση με αναλογία μηλονικής διαλδεύδης/θειοβαρβιτουρικού οξέος = 1/2. Τα TBARS, επομένως, μπορούν να εκφραστούν ως ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης. Τελικά, αυτή μετράται φωτομετρικά και έτσι προσδιορίζεται ο βαθμός στον οποίο τα λιπίδια υφίστανται υπεροξειδωση.

Εδώ χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρώς τροποποιημένη μέθοδος για τον υπολογισμό τους (35).

Πειραματική διαδικασία:

Προσθέτουμε 20 μ L ομογενοποιημένου ιστού σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15ml) για τα δείγματα και 20 μ L PBS για το τυφλό. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 500 μ L Tris-HCl και 500 μ L TCA 35% και αναδεύουμε (vortex). Επωάζουμε για 10 min στους 25°C. Όταν η επώαση ολοκληρωθεί προσθέτουμε 1mL Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM) και επωάζουμε για δεύτερη φορά για 45 min τώρα στο υδατόλουτρο

(95°C). Όταν ολοκληρωθεί και αυτό το στάδιο της επώασης, τα falcons μεταφέρονται στο ψυγείο για 5 min. Ακολούθως, προσθέτουμε 1mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1mL από τα falcons σε σωληνάκια και φυγοκεντρούμε (11200g, 25°C, 3 min). Τέλος, μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

2.7 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια

Μέθοδος:

Οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες. Τα επίπεδα οξείδωσης μπορούν να αποτιμηθούν μέσω της τεχνικής των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) C=O αποτελούν μέρος άλλων μεγαλύτερων λειτουργικών ομάδων. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της θρεονίνης, της λυσίνης, της αργινίνης και της προλίνης.

Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες δεν έχουν σωστή λειτουργία, καθώς έχουν υποστεί βλάβες. Για παράδειγμα, μια μετρίου βαθμού καρβονυλίωση δε θα επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό την διάσπαση πρωτεϊνών από το πρωτεόσωμα, ενώ σε περίπτωση σοβαρότερων βλαβών, η αποικοδόμηση δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και αυτό θα είχε ως συνέπεια τη συγκέντρωσή τους σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Τα καρβονύλια αντιδρούν με το DNPH (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) σχηματίζοντας το 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου, και έτσι μπορούμε να τα ανιχνεύσουμε πειραματικά (36).

Πειραματική διαδικασία:

Σε 20 μl δείγματος ιστού προσθέτουμε 380 μl PBS και στη συνέχεια αναδεύουμε. Έπειτα, προσθέτουμε 0,5 ml DNPH (10 mM, διαλυμένο σε HCl 2.5 M) στα δείγματα και 0,5 ml HCl 2,5 M στα τυφλά, αναδεύουμε και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 1h με ανάδευση κάθε 15 min. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το βήμα, προσθέτουμε 100 μl 100% TCA και φυγοκεντρούμε (15.000g, 5 min, 4°C). Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml αιθανόλης/οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v), αναδεύουμε τα δείγματα και φυγοκεντρούμε (15.000g, 5 min, 4°C). Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές.

Προσθέτουμε 1mL ουρία (5M, pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 min. Τέλος, φυγοκεντρούμε για μια ακόμη φορά (15.000g, 5 min, 4°C) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε κυψελίδα για μέτρηση της απορρόφηση στα 370 nm.

3. Western-blot για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ -GCL, SOD-1 και CAT

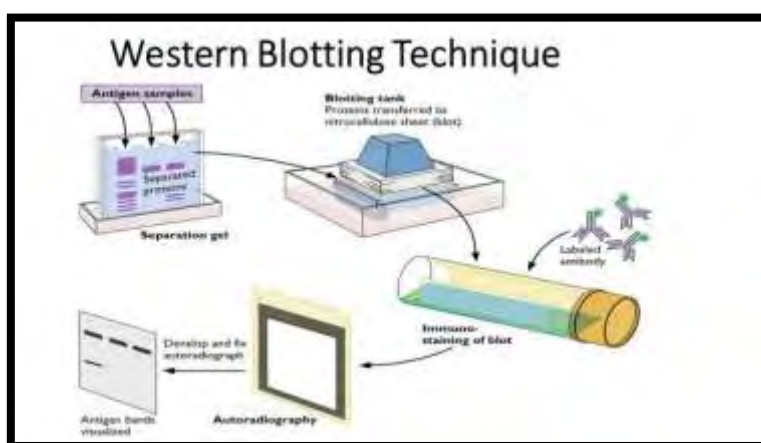
🚩 Γενικά για Western Blot:

Είναι μια τεχνική με την οποία οι πρωτεΐνες, εφόσον διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται από την πηκτή ηλεκτροφόρησης σε ένα μεμβρανώδες υλικό στήριξης και στη συνέχεια ανιχνεύονται με χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές όπως είναι το dot blot, 2D blot, western blot. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η τελευταία μέθοδος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης καθώς προσφέρει μεγαλύτερη ταχύτητα και ευαισθησία. Οι πιο συνηθισμένες μεμβράνες που χρησιμοποιούνται είναι: μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, νάιλον ή PVDF. Πάνω σε αυτές προσδένονται (μη ομοιοπολικά ή/και με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) και ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες με τη σειρά που έχουν διαχωριστεί. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών, η πηκτή βάφεται αντιστρεπτά με χρωστικές (π.χ. Coomassie Blue R-250) ή τοποθετούνται έγχρωμοι μάρτυρες MB για να εξακριβωθεί η επιτυχημένη μεταφορά τους και έπειτα γίνεται η ανοσοεντόπιση με τη χρήση αντισωμάτων. Η ανίχνευση γίνεται με διάφορους τρόπους όπως π.χ. με το σύστημα ECL (κυρίως για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP), το οποίο έχει μεγάλη ευαισθησία και στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια.

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Εδώ, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα SOD-1, CAT και γ -GCL με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης του ολικού ιστού. Σ' αυτόν, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και ακολούθησε θέρμανση στους 95°C για 3 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 8% SDS-PAGE για 45 min στα 150 V. Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη (PVDF) μέσω ηλεκτροφόρησης για 2 h στα 110 V. Μετά την μεταφορά, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα 1×TBST με 5% αποβουτυρωμένο γάλα στους 4

°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Ακολούθως, η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με τα πρωτογενή αντισώματα (anti-SOD1, αραιώση 1:600; anti- γ -GCL, αραιώση 1:600; anti-CAT, αραιώση 1:400) σε διάλυμα 1× TBST με 5% αποβουτυρωμένο γάλα. Ακολούθησαν 5 πλύσεις για 5 min η καθεμία με 1× TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-rabbit, αραιώση 1:5000; anti-goat, αραιώση 1:3000) για 30 λεπτά σε 1× TBST με 5% αποβουτυρωμένο γάλα. Ακολούθησαν 3 πλύσεις για 15 min η καθεμία με 1× TBST. Μετά από αυτή τη διαδικασία, η μεμβράνη εκτέθηκε στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για 1 λεπτό και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση σήματος με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτήθηκε από την ένταση και την ποιότητα του σήματος. Ως πρωτεΐνη κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η GAPDH, ενώ η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Alpha Innotech.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής western blot

4. Real-time PCR (sod1, gclc, cat)

4.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς έγινε με χρήση εμπορικού κιτ (Qiagen). Η διαδικασία περιλαμβάνει: α) τη λύση των κυττάρων, β) την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη, γ) την κατακράτηση των νουκλεϊκών οξέων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη και δ) την προσθήκη H₂O για συλλογή νουκλεϊκών οξέων, λόγω του αντίθετου φορτίου τους.

Ακολούθησε η λύση του DNA με τη βοήθεια DNAσης και η μετατροπή του mRNA σε cDNA, με τη χρήση oligo-dTs, τα οποία προσδένονται στην poly(A) ουρά των mRNA. Η επιμήκυνση της αλυσίδας γίνεται με τη βοήθεια της αντίστροφης

μεταγραφάσης, η οποία προσθέτει δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα έχοντας ως μήτρα τα ριβονουκλεϊκά οξέα.

4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων

Μέθοδος:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) στηρίζεται στην αρχή της PCR, και σε πραγματικό χρόνο προσδιορίζει τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, η real-time PCR συνδυάστηκε με τη χρωστική SYBR-Green (absorption = 492nm / emission = 516 nm) , η οποία μπορεί να προσδένεται πάνω σε dsDNA και να εκπέμπει φθορισμό.

Στα αρχικά στάδια της qPCR, ο εκπεμπόμενος φθορισμός δεν ξεπερνά την ουδό που απαιτείται (Ct – Cycle Threshold), ενώ στη διάρκεια της εκθετικής φάσης ο φθορισμός διπλασιάζεται ανά κύκλο. Μετά τον 35ο κύκλο περίπου, η ένταση του σήματος φτάνει σε πλατώ, οπότε και σταματάει ο πολλαπλασιασμός (37).

Η ενίσχυση των τμημάτων cDNA όλων των γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (*gclc*, *cat*, *sod1*) καθώς και του γονιδίου κανονικοποίησης (*actin*) πραγματοποιήθηκε σε αντιδράσεις των 10 μ L που περιείχαν SYBR® Select Master Mix (2X, applied biosystems, USA), 0.25 μ M από τον κάθε εκκινητή, 50 nM ROX Low και 25 ng cDNA. Ο σχηματισμός των εκκινητών βασίστηκε στη διεθνή βιβλιογραφία.

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

Οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή (μ x3005P system, Stratagene, UK) ήταν οι ακόλουθες: 45 κύκλοι από 15 sec στους 95 °C, 30 sec στους 55°C, 30 sec στους 72oC.

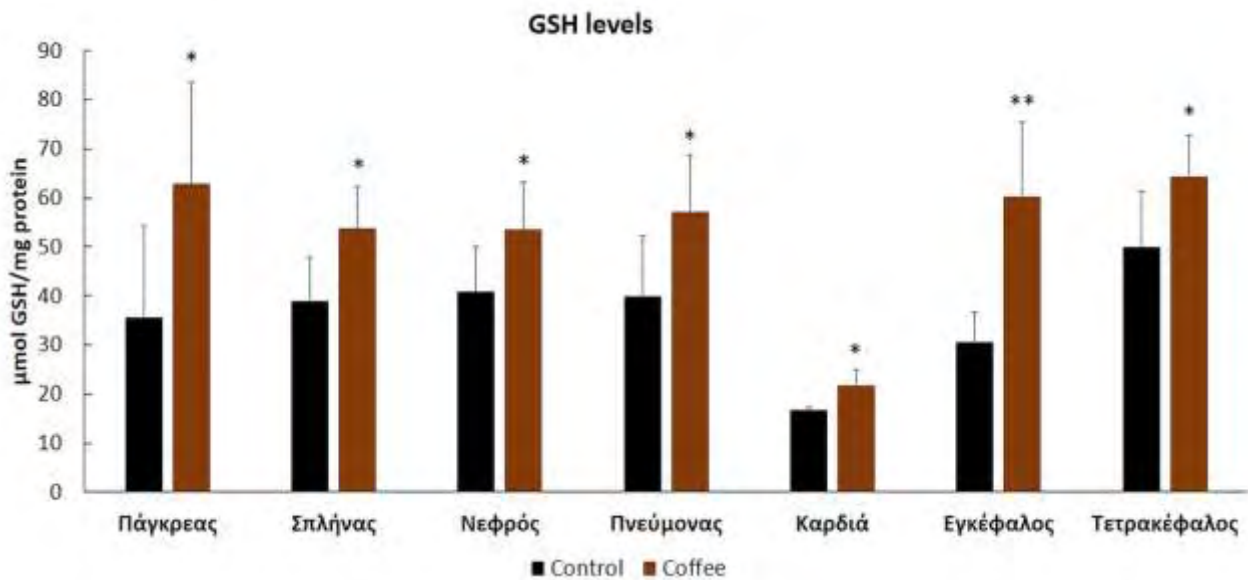
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνει κανονικοποίηση ως προς ένα γονίδιο αναφοράς, για να ελέγχονται τα εσωτερικά σφάλματα της real-time PCR. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β -ακτίνης.

5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 20.0 και συγκεκριμένα με τη μέθοδο ANOVA με στάθμη σημαντικότητας το $p < 0,05$.

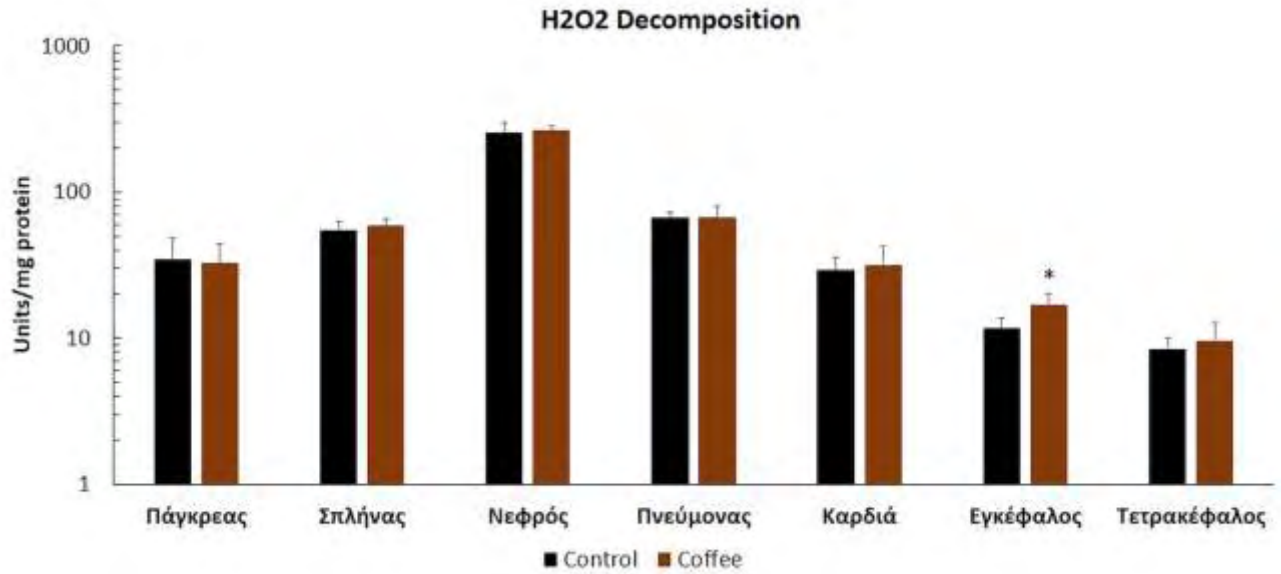
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Προσδιορισμός δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους ιστούς



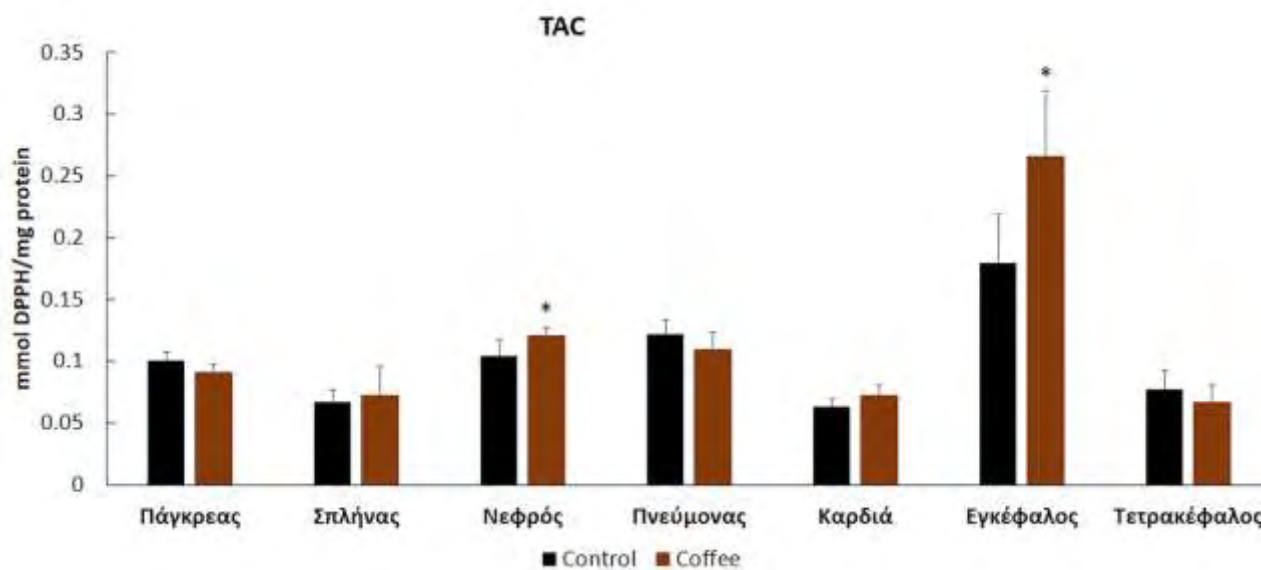
Διάγραμμα 1: Σύγκριση των επιπέδων της γλουταθειόνης στους 7 ιστούς: Πάγκρεας, Σπλήνας, Νεφρός, Πνεύμονας, Καρδιά, Εγκέφαλος, Τετρακέφαλος

Η κατανάλωση καφέ οδήγησε σε σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης σε όλους τους εξεταζόμενους ιστούς, ένα πολύ σημαντικό εύρημα, καθώς πρόκειται για το σημαντικότερο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο. Αναλυτικότερα, στο πάγκρεας αυξήθηκε κατά 76.5%, στο σπλήνα κατά 37.8%, στον νεφρό κατά 31.3%, στον πνεύμονα κατά 43.4%, στην καρδιά κατά 31.3%, στον εγκέφαλο κατά 97.1% και στον τετρακέφαλο κατά 29.2% (Διάγραμμα 1).



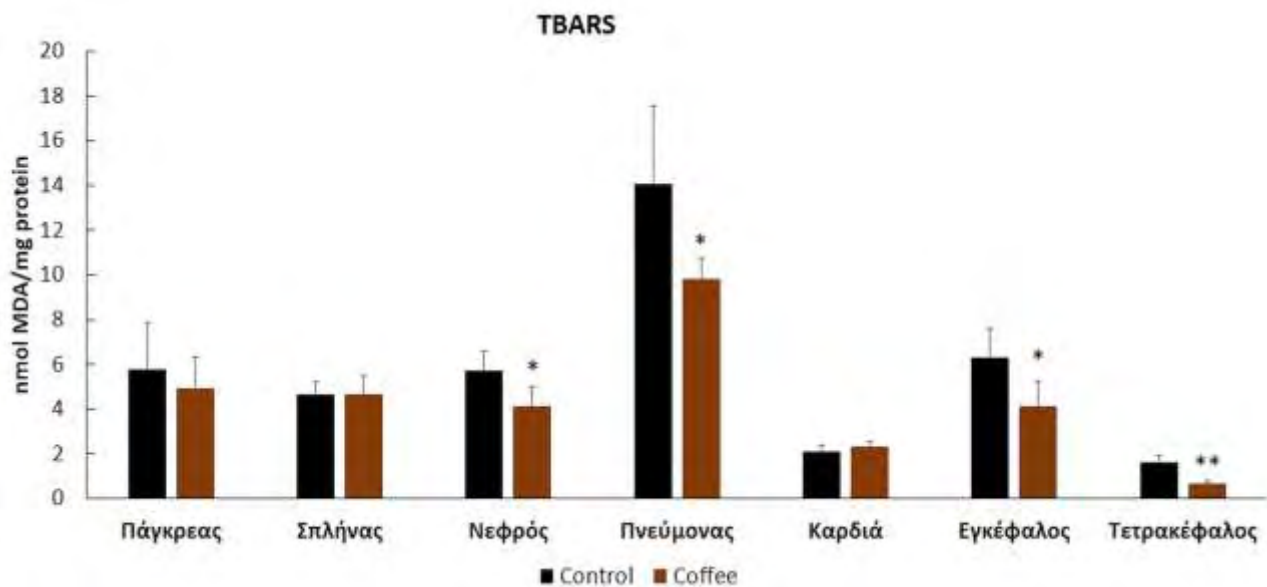
Διάγραμμα 2: Σύγκριση της ικανότητας αποικοδόμησης του H₂O₂ στους 7 ιστούς: Πάγκρεας, Σπλήνας, Νεφρός, Πνεύμονας, Καρδιά, Εγκέφαλος, Τετρακέφαλος

Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζεται η ικανότητα διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Πρόκειται για μια από τις σημαντικότερες μορφές ROS που παράγεται συνεχώς εντός του οργανισμού και η διάσπαση του καταλύεται από ένζυμα όπως η καταλάση και οι περοξειρεδοξίνες. Σε έναν ιστό μόνο (Εγκέφαλος) παρατηρήθηκε αύξηση στην ικανότητα διάσπασης κατά 43.6%, γεγονός που υποδηλώνει βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.



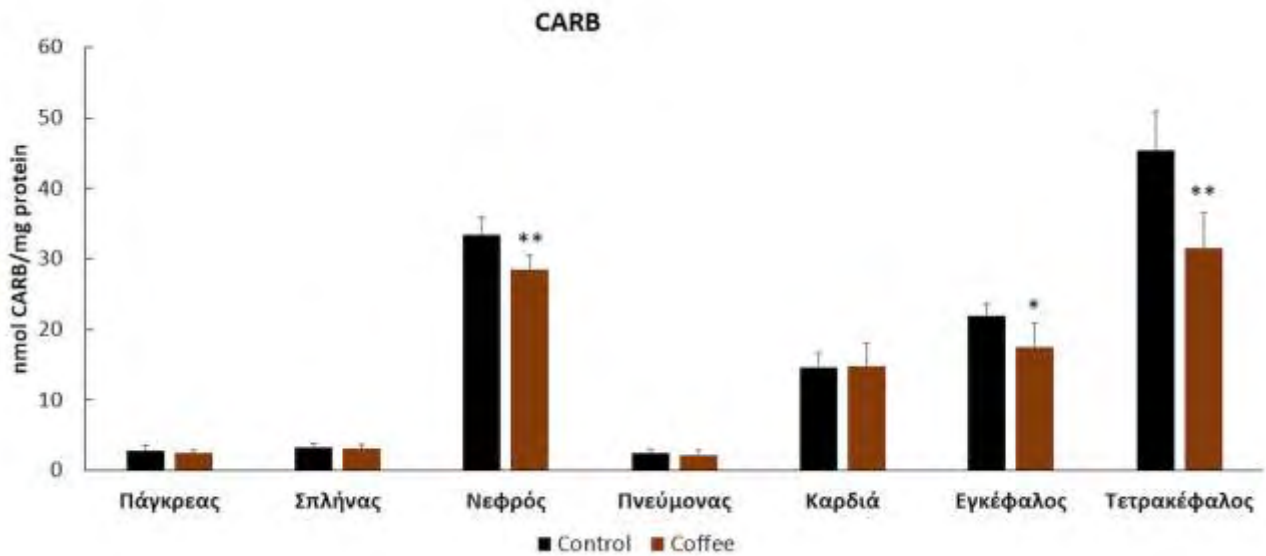
Διάγραμμα 3: Σύγκριση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους 7 ιστούς: Πάγκρεας, Σπλήνας, Νεφρός, Πνεύμονας, Καρδιά, Εγκέφαλος, Τετρακέφαλος

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αντικατοπτρίζει την συνολική ικανότητα ενός ιστού να εξουδετερώνει μια ρίζα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3, μόνο ο νεφρός και ο εγκέφαλος παρουσίασαν αυξημένη TAC έπειτα από κατανάλωση καφέ. Αναλυτικότερα, στον νεφρό η αύξηση ανέρχεται στο 16.0%, ενώ στον εγκέφαλο φτάνει το 48.4%.



Διάγραμμα 4: Σύγκριση των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης στους 7 ιστούς: Πάγκρεας, Σπλήνας, Νεφρός, Πνεύμονας, Καρδιά, Εγκέφαλος, Τετρακέφαλος

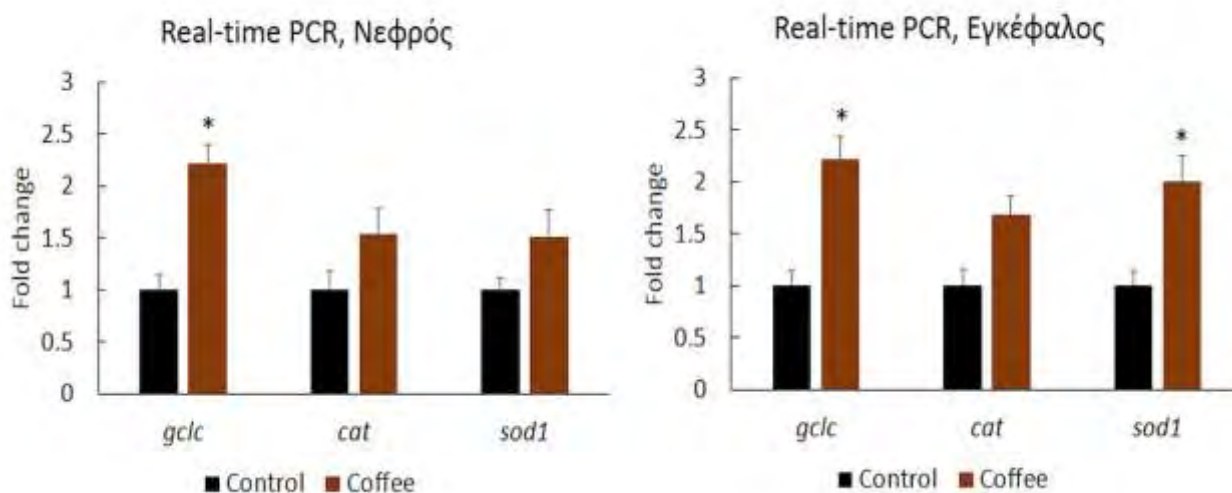
Ο καφές μείωσε τα επίπεδα οξείδωσης των λιπιδίων σε 4 από τους 7 εξεταζόμενους ιστούς (Διάγραμμα 4). Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε μείωση στον νεφρό κατά 27.9%, στον πνεύμονα κατά 30.5%, στον εγκέφαλο κατά 34.8% και στον τετρακέφαλο κατά 60.4%.



Διάγραμμα 5: Σύγκριση των επιπέδων της πρωτεϊνικής οξειδωσης στους 7 ιστούς: Πάγκρεας, Σπλήνας, Νεφρός, Πνεύμονας, Καρδιά, Εγκέφαλος, Τετρακέφαλος

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στον νεφρό όπου μειώθηκε η οξειδωση κατά 14.8%, στον εγκέφαλο κατά 20.2% και στον τετρακέφαλο κατά 30.5%.

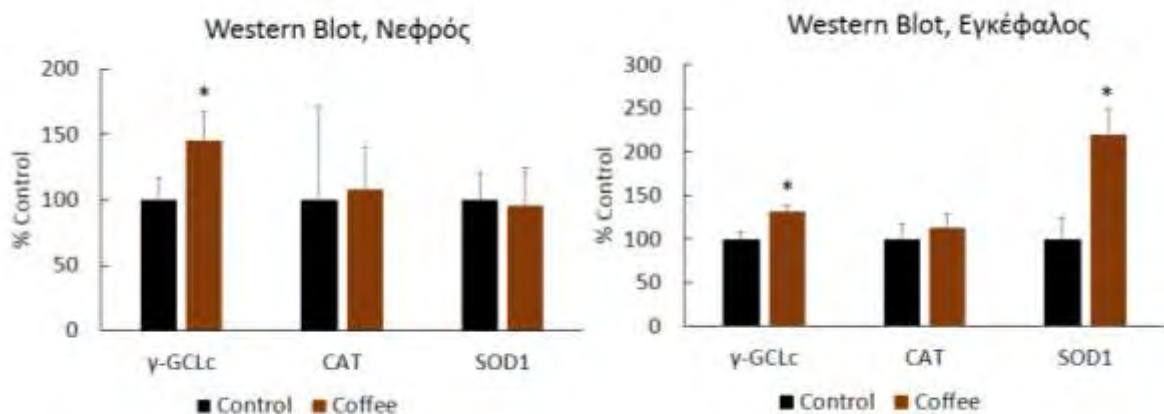
B. Real-time PCR (sod1, gclc, cat)



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα της Real-Time PCR για τα γονίδια gclc, cat και sod1 στους 2 υπό μελέτη ιστούς (νεφρός, εγκέφαλος).

Στην Real-Time PCR εξετάστηκαν οι δυο από τους επτά ιστούς και συγκεκριμένα ο νεφρός και ο εγκέφαλος, όπως και στη μέθοδο Western-blot για την έκφραση των πρωτεϊνών. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο γονίδιο της γ -GCL (*gclc*), του οποίου η έκφραση αυξήθηκε από τον καφέ κατά 2.2 φορές και στους δύο ιστούς. Ακόμα, στον εγκέφαλο αυξήθηκαν και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *sod1* κατά 2 φορές (Διάγραμμα 6).

Γ. Western-blot Analysis για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ενζύμων γ-GCL, SOD-1 και CAT



Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα της τεχνικής Western-blot για τα επίπεδα των πρωτεϊνών γ-GCL, CAT και SOD1 στους 2 υπό μελέτη ιστούς (νεφρός, εγκέφαλος).

Στο Διάγραμμα 7, παρατίθενται τα επίπεδα των πρωτεϊνών γ-GCL, CAT και SOD1 στους δυο ιστούς που μελετήθηκαν. Η στατιστικώς σημαντική διαφορά, αφορά τα επίπεδα έκφρασης την γ-GCL σε νεφρό και εγκέφαλο και τα επίπεδα έκφρασης της SOD1 στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή (γ-GCL) αυξήθηκε κατά 45.0 % στο νεφρό, και κατά 31.3 % στον εγκέφαλο, ενώ τα επίπεδα της SOD1 αυξήθηκαν κατά 119.6% στον εγκέφαλο. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με τα ευρήματα της Real-Time PCR για τα επίπεδα mRNA.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το συγκεκριμένο πείραμα είχε σκοπό να ερευνήσει τη δραστικότητα του καφέ, ενός πολύ δημοφιλούς ροφήματος παγκοσμίως, εξαιτίας των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι κόκκοι του καφέ περιέχουν βιοδραστικά συστατικά όπως η καφεΐνη, διτερπένια και διάφορες πολυφαινόλες με βασικότερες τα χλωρογενικά οξέα (39). Για να παρασκευαστεί το ρόφημα του καφέ απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επεξεργασία των κόκκων του. Αυτό συμβαίνει με το καβούρδισμα των πράσινων κόκκων σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 200°C) και για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα αναλόγως τον τύπο του ροφήματος (40,41). Οι υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της σύστασης και των ιδιοτήτων των κόκκων του καφέ. Η σημαντικότερες αντιδράσεις που συμβαίνουν όταν ανεβαίνουμε σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες είναι οι αντιδράσεις μη ενζυμικής αμαύρωσης τύπου Maillard. Αυτές οδηγούν στη δημιουργία μελανοϊδινών, καινούριων ενώσεων με υψηλό μοριακό βάρος. Τα μόρια αυτά είναι πιθανό να εμφανίζουν βιοδραστικότητα, προσδίδοντας στον καβουρδισμένο κόκκο διαφορετικές ιδιότητες από τον πράσινο (42,43).

Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για τη δραστικότητα του καφέ είναι διαφορούμενα, με άλλα να έχουν δείξει ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία, ενώ άλλα να μην έχουν δώσει κάποιο σημαντικό εύρημα (44,45). Οι περισσότερες από τις μελέτες αφορούσαν είτε απευθείας χορήγηση του ροφήματος σε ανθρώπους είτε *in vitro* πειράματα για μελέτη της αντιοξειδωτικής του ικανότητας. Όμως, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για το μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολήθηκε με την επίδραση ενός εκχυλίσματος καφέ στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε επτά ιστούς επίμυων. Το εκχύλισμα που χορηγήθηκε ήταν το ισχυρότερο σε μια σειρά *in vitro* πειραμάτων που προηγήθηκαν, γι' αυτό και επιλέχθηκε (17,27–31).

Ο καφές χορηγήθηκε για χρονικό διάστημα 14 ημερών στο νερό των επίμυων σε δόση που αντιστοιχεί σε ημερήσια κατανάλωση 3-4 καφέδων από τον άνθρωπο. Οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν ο εγκέφαλος, ο νεφρός, ο σπλήνας, το πάγκρεας, ο πνεύμονας, η καρδιά, και ο τετρακέφαλος. Με βάση τα αποτελέσματα που

προέκυψαν, οι επίμυες που κατανάλωσαν καφέ εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και στους επτά ιστούς κατά 29.2 - 97.1%, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στον εγκέφαλο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς η ανηγμένη γλουταθειόνη, όπως αναφέρθηκε, είναι το σημαντικότερο μη ενζυμικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται: α) σε «αντικατάσταση» της γλουταθειόνης από τα αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ, τα οποία εν συνεχεία αντιμετωπίζουν την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση υψηλών επιπέδων γλουταθειόνης και β) σε αύξηση της βιοσύνθεσης ή του ρυθμού ανακύκλωσης του τριπεπτιδίου λόγω αυξημένης έκφρασης των ενζύμων που την καταλύουν.

Ο δεύτερος δείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκε ήταν ο ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπου εκεί παρατηρήθηκε αύξηση μόνο στον εγκέφαλο κατά 43.6 %. Ο συγκεκριμένος δείκτης αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα δύο κατηγοριών ενζύμων, της καταλάσης και των περοξειρεδοξινών. Η παρατηρούμενη αύξηση είναι αξιοσημείωτη καθώς για να φτάσουν οι βιοδραστικές ουσίες στον εγκέφαλο, είναι αναγκαίο να διέλθουν μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς.

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και εδώ αύξηση παρατηρήθηκε στον νεφρό κατά 16.0%, και στον εγκέφαλο κατά 48.4%. Αυτό φανερώνει μια ισχυρή επίδραση του ροφήματος στους ιστούς αυτούς. Ακόμα, συνδυαστικά με τα παραπάνω, διαφαίνεται μια τάση του καφέ να επηρεάσει έντονα την οξειδοαναγωγική κατάσταση του εγκεφάλου, γεγονός με πιθανώς σημαντικές προεκτάσεις σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (46).

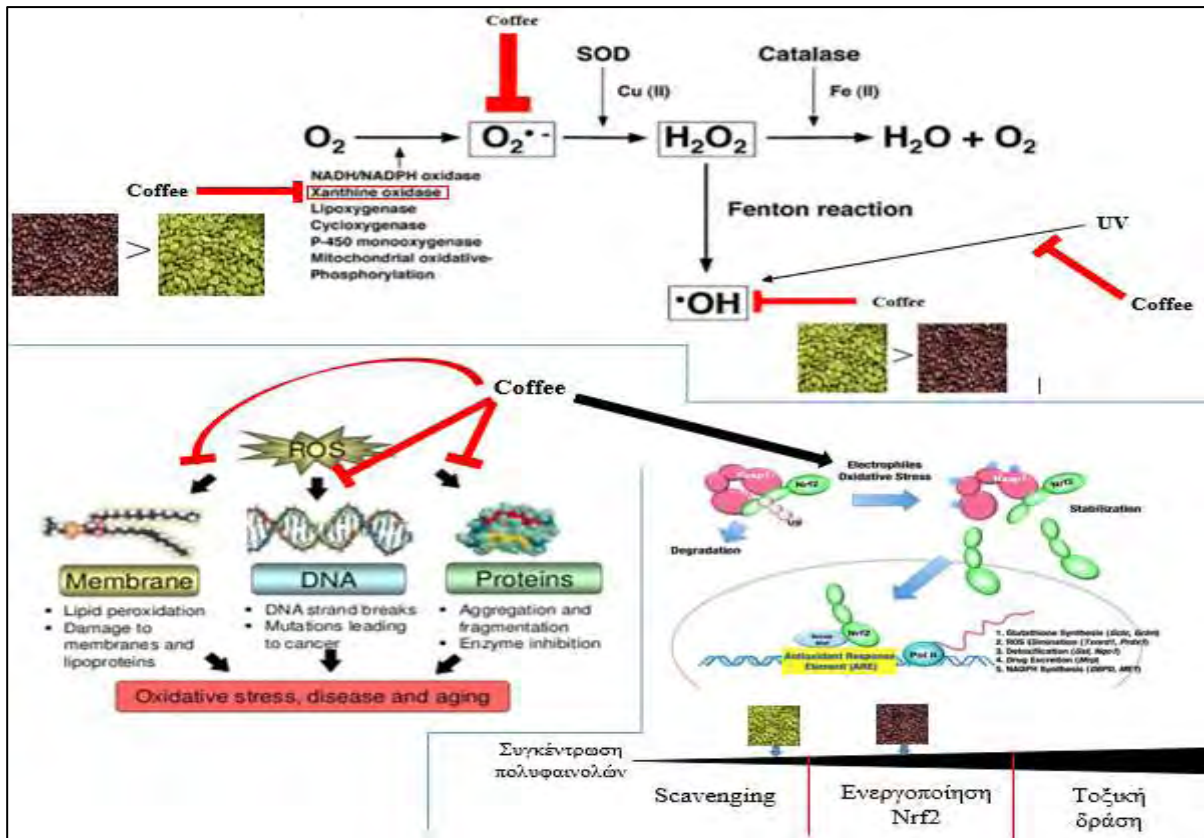
Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκαν διαφορές στους τρεις δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των ιστών, γεγονός που τονίζει τη σημασία του να αποτιμάται πληθώρα δεικτών σε ένα δείγμα για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ιστού κι ενός εκχυλίσματος.

Ως προς τους δύο δείκτες οξείδωσης μακρομορίων (TBARS, CARB), τα δεδομένα διαφοροποιούνται. Στη μεν οξείδωση λιπιδίων παρατηρήθηκε διαφορά στους ιστούς: νεφρό, πνεύμονα, εγκέφαλο και τετρακέφαλο, με στατιστικώς σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που δεν κατανάλωσε καφέ, στη

δε οξειδωση πρωτεϊνών εντοπίστηκε μείωση στο νεφρό, τετρακέφαλο και εγκέφαλο. Και σε αυτή την περίπτωση ο καφές επέδειξε προστατευτική δράση στον εγκέφαλο, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα βιοδραστικά συστατικά του διέρχονται του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την ικανότητα των βιοδραστικών συστατικών του καφέ να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (47–49).

Σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό δράσης του καφέ, γνωρίζουμε πως οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν πλειοτροπικό τρόπο δράσης, καθώς σε χαμηλή συγκέντρωση έχουν απευθείας αντιοξειδωτική δράση μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (50). Παρ' όλα αυτά, πάνω από μια ουδό συγκέντρωσης, οι πολυφαινόλες δρουν προ-οξειδωτικά, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του Nrf2 και κατ' επέκταση στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιοξειδωτική δράση (51).

Η αναστολή των ελευθέρων ριζών από εκχύλισμα καφέ έχει αναφερθεί σε προηγούμενη –δημοσιευμένη– μελέτη του εργαστηρίου ενώ και η ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του Nrf2 αναφέρθηκε σε μια άλλη –επίσης δημοσιευμένη– μελέτη (17,31). Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από χορήγηση σε μυοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, το ελαφρώς καβουρδισμένο εκχύλισμα Brazil R4 (αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία) προκάλεσε αύξηση έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό (βιοσύνθεση και ανακύκλωση) της γλουταθειόνης, όπως οι γ-GCL και GSR. Επιπλέον, αυξήθηκε η έκφραση του NQO1 που εξουδετερώνει κινόνες και προστατεύει από την οξειδωση μακρομορίων, καθώς και η έκφραση των SOD1 και θειορεδοξίνης 1 (Trx1, που σχετίζεται με την αναγέννηση οξειδοαναγωγικών ενζύμων).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοριακού μηχανισμού δράσης του καφέ.

Στο παρόν πείραμα, αποτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης (mRNA, πρωτεΐνη) της CAT, της SOD1 και της γ -GCL. Αυτά είναι γονίδια-στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, που, όπως αναφέραμε, φαίνεται πως συμμετέχει στο μηχανισμό δράσης του καφέ (52). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν ο εγκέφαλος και ο νεφρός, καθώς σε αυτούς τους ιστούς παρατηρήθηκε η ισχυρότερη επίδραση έπειτα από κατανάλωση καφέ.

Ως προς τα επίπεδα mRNA των τριών ενζύμων πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR στους δυο προαναφερθέντες ιστούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο γονίδιο της γ -GCL (*gclc*), του οποίου η έκφραση αυξήθηκε από τον καφέ κατά 2.2 φορές και στους δύο ιστούς. Ακόμα, στον εγκέφαλο αυξήθηκαν και τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *sod1* κατά 2 φορές.

Έπειτα, ακολούθησε η τεχνική Western blot προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η αύξηση των επιπέδων μεταγραφής συνδυάστηκε με την αύξηση των επιπέδων μετάφρασης. Προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά, η οποία αφορά τα επίπεδα

έκφρασης την γ - GCL σε νεφρό και εγκέφαλο και τα επίπεδα έκφρασης της SOD1 στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, η γ - GCL αυξήθηκε κατά 45.0 % στο νεφρό, και κατά 31.3 % στον εγκέφαλο, ενώ τα επίπεδα της SOD1 αυξήθηκαν κατά 119.6% στον εγκέφαλο.

Συνολικά, φαίνεται ότι η κατανάλωση καφέ βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση, λόγω των αυξημένων επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (εξαιτίας της αυξημένης βιοσύνθεσής της). Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση της οξείδωσης λιπιδίων ή/και πρωτεϊνών. Αυτά τα δυο ευρήματα αποδεικνύουν την ευεργετική επίδραση του καφέ έπειτα από μέτρια κατανάλωση. Συνδυαστικά με παράλληλη δουλειά στους υπόλοιπους ιστούς που μελετήθηκαν, φάνηκε πως ο καφές έχει ισχυρή επίδραση στο γαστρεντερικό σύστημα και γενικά παρατηρείται αύξηση της γλουταθειόνης σε όλους τους ιστούς. Στους υπόλοιπους δείκτες παρατηρήθηκαν διαφορές, υποδηλώνοντας την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοδραστικών συστατικών του καφέ και του κάθε ιστού ξεχωριστά.

Η συγκεκριμένη μελέτη στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διατριβής έρχεται να προστεθεί σε μια σειρά προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου που παρουσιάζουν την ικανότητα ποικίλων φυτικών εκχυλισμάτων να δρουν προστατευτικά για ορισμένα κυτταρικά μακρομόρια, παρεμποδίζοντας οξειδωτικές βλάβες και εμφανίζοντας χημειοπροστατευτική δράση (53–57).

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας έρχονται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρεται στις ευεργετικές επιπτώσεις της χορήγησης καφέ σε ζωικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με μια μελέτη σε αρουραίους, η πρόσληψη καφέ βελτίωσε τη μακροπρόθεσμη μνήμη όταν δοκιμάστηκε με αναγνώριση αντικειμένων. Ωστόσο, αυτό δεν συνοδεύτηκε από αύξηση των κινητικών και διερευνητικών δραστηριοτήτων. Επιπλέον, η χρόνια πρόσληψη καφέ και καφεΐνης μείωσε την υπεροξείδωση λιπιδίων των μεμβρανών του εγκεφάλου και αύξησε τη συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης. Οι δραστηριότητες των GR και SOD αυξήθηκαν παρομοίως, αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη δραστηριότητα GPx. Έτσι, εκτός από τη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας, τα δεδομένα δείχνουν ότι η χρόνια κατανάλωση καφέ διαμορφώνει το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα στον εγκέφαλο. Επομένως, η χρόνια πρόσληψη καφέ, μέσω της προστασίας του αντιοξειδωτικού συστήματος, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της μείωσης της γνωστικής λειτουργίας που σχετίζεται με την ηλικία (58).

Σε μια δεύτερη μελέτη, βρέθηκε πως η κατανάλωση στέρεου καφέ είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενζύμων αποτοξικοποίησης (GSTs) μέσω ενεργοποίησης του Nrf2 στο ήπαρ αρουραίων (59). Σε άλλη μελέτη, ο καφές προκάλεσε επαγωγή ενός ενζύμου (γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση, UGT) το οποίο παίρνει μέρος στον μεταβολισμό και την αποτοξικοποίηση, στο ήπαρ και τον στόμαχο ποντικών (60).

Οι παραπάνω έρευνες προσφέρουν μια εικόνα της σημαντικότητας των διατροφικών παραγόντων για τη βελτίωση της λειτουργίας του οργανισμού, ωστόσο πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα και ο μεταβολισμός του κάθε πιθανού βιολειτουργικού μορίου. Συγκεκριμένα, στον καφέ οι κύριες βιολειτουργικές ενώσεις είναι τα χλωρογενικά οξέα, τα οποία εμφανίζουν υψηλή απορρόφηση από τον οργανισμό, που αγγίζει το 30% (61,62), γεγονός που καθιστά τον καφέ ως μια σημαντική πηγή διαιτητικών αντιοξειδωτικών.

Συνοψίζοντας, παρότι δεν γνωρίζουμε ακόμη τον ακριβή μηχανισμό δράσης του καφέ, η διεξαγωγή ερευνών όπως η συγκεκριμένη είναι σημαντική καθώς έτσι θα διευκρινιστεί η επίδραση του καφέ σε κάθε ιστό ενός οργανισμού ξεχωριστά. Σε αντίθεση με τα *in vitro* πειράματα, τα *in vivo* λαμβάνουν υπ' όψιν την απορρόφηση και τον μεταβολισμό των υπό εξέταση ουσιών. Με τον τρόπο αυτό αποκτούμε μια πιο πλήρη εικόνα σχετικά με την επίδραση τους στη φυσιολογία του οργανισμού.

Βιβλιογραφία

1. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo*. 1999;13(3):295–309.
2. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):872–9.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA; 2015.
4. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015 Jun;97:55–74.
5. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988 Mar;5(3):156–70.
6. Di Meo S VP. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*. 2001;10:125–40.
7. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008 Jun;4(2):89–96.
8. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453–62.
9. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan;30(1):11–26.
10. SIES H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 1993.
11. Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*. 2002 Nov;33(9):1260–7.
12. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957–97.
13. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(5):3217–66.
14. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Jun;27(6):608–19.
15. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003 Jul;333(1):19–39.
16. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;
17. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DA, Tsatsakis AM, et al. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep*. 2015;
18. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1231–46.

19. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 Jan;50(3):586–621.
20. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R, Vari R, et al. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences Switzerland*; 2010 p. 1321–42.
21. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
22. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:801457.
23. Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients.* 2015;8(1):1–20.
24. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol.* 2012;2(December):1–13.
25. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76–86.
26. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1–2):86–98.
27. Priftis A, Goutzourelas N, Chalabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Amoutzias GDGD, et al. Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mech Ageing Dev.* 2017 Nov;
28. Priftis A, Panagiotou EME-ME-M, Lakis K, Plika C, Halabalaki M, Ntasi G, et al. Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food Chem Toxicol.* 2018 Apr;114:119–27.
29. Priftis A, Papikinos K, Koukoulanaki M, Kerasioti E, Stagos D, Konstantinopoulos K, et al. Development of an assay to assess genotoxicity by particulate matter extract. *Mol Med Rep.* 2017 Apr;15(4):1738–46.
30. Priftis A, Mitsiou D, Halabalaki M, Ntasi G, Stagos D, Skaltsounis LA, et al. Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2018 May;829–830:33–42.
31. Priftis A, Angeli-Terzidou A-EA-E, Veskokouk ASAS, Spandidos DADADA, Kouretas D. Cellspecific and roastingdependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Mol Med Rep.* 2018 Apr;17(6).
32. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoruso DC, Ribecco MT, Romano A, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology.* 2010;52(5):1652–61.

33. Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell C*. 2004 Jan;61(2):192–208.
34. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(3):231–6.
35. Keles M, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant protein in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences*. 2001 May;28(2):141–3.
36. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*. 2004 Mar;357(2):83–6.
37. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003;3:18.
38. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6(4):279–84.
39. Nuhu AA. Bioactive micronutrients in coffee: recent analytical approaches for characterization and quantification. *ISRN Nutr*. 2014;2014:384230.
40. Perrone D, Farah A, Donangelo CM. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *J Agric Food Chem*. 2012 May;60(17):4265–75.
41. Smrke S, Opitz SEW, Vovk I, Yeretian C. How does roasting affect the antioxidants of a coffee brew? Exploring the antioxidant capacity of coffee via on-line antioxidant assays coupled with size exclusion chromatography. *Food Funct*. 2013 Jul;4(7):1082–92.
42. Delgado-Andrade C. Maillard reaction products: Some considerations on their health effects. Vol. 52, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2014.
43. Moreira ASP, Nunes FM, Domingues MR, Coimbra MA. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Funct*. 2012;3(9):903–15.
44. Frost-Meyer NJ, Logomarsino J V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. *J Funct Foods*. 2012 Oct;4(4):819–30.
45. Natella F, Nardini M, Belevi F, Scaccini C. 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*. 2007 Sep;86(3):604–9.
46. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med*. 2014 Jun;16(2):217–30.
47. Lee K, Lee BJ, Bu Y. Protective effects of dihydrocaffeic acid, a coffee component

- metabolite, on a focal cerebral ischemia rat model. *Molecules*. 2015;
48. Lardeau A, Poquet L. Phenolic acid metabolites derived from coffee consumption are unlikely to cross the blood-brain barrier. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;
 49. Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010.
 50. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*. 2008 Aug;476(2):107–12.
 51. Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 Jul;3(4):228–37.
 52. Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, et al. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J Nutr Biochem*. 2011 May;22(5):426–40.
 53. Kerasioti E, Stagos D, Georgatzi V, Bregou E, Priftis A, Kafantaris I, et al. Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6585737.
 54. Kerasioti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AMAMAMAMAM, Hayes AWW, et al. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem*. 2014 Jul;155:271–8.
 55. Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, et al. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol Med Rep*. 2015;12(4).
 56. Goutzourelas N, Stagos D, Housmekeridou A, Karapoulou C, Kerasioti E, Aligiannis N, et al. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2015 Aug;36(2):433–41.
 57. Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, et al. Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *J Agric Food Chem*. 2008 Aug;56(16):6967–76.
 58. Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;99(4):659–64.
 59. Cavin C, Marin-Kuan M, Langouët S, Bezençon C, Guignard G, Verguet C, et al. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol*. 2008 Apr;46(4):1239–48.
 60. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Coffee Induces Expression of Glucuronosyltransferases by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Nrf2 in Liver and Stomach. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1699–1710.e2.
 61. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM LS. 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *J Nutr*. 2008;(September):2309–15.

62. Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozier A. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*. 2010 Aug;2(8):820–33.