



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΛΙΑΣ»**

Κουκούτση Μαρία

Λάρισα 2023

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΛΙΑΣ»**

**“STUDY OF THE REDOX STATE OF CELL LINES AFTER
TREATMENT WITH OLIVE EXTRACTS”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Βεσκούκης Αριστείδης: Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νέπκα Χαρίτινη: Ιατρός - Κυτταροπαθολόγος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Τοξικολογία».

Για τη διεκπεραίωση της, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κύριο Δημήτριο Κουρέτα για την αμέριστη βοήθεια του στην υλοποίηση της. Η επιστημονική καθοδήγηση του ήταν καταλυτικής σημασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Καλλιρρόη Τεριζή για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια της καθ'όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, καθώς και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Κούρτη για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Ελεύθερες ρίζες	9
1.2. Κατηγορίες ελευθέρων ριζών	10
1.3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	11
1.3.1. Ενδογενείς πηγές	11
1.3.1.1. Κυτταρόπλασμα	12
1.3.1.2. Μιτοχόνδρια	12
1.3.1.3. Υπεροξειδισώματα	13
1.3.1.4. Ενδοπλασματικό δίκτυο	14
1.3.1.5. Κυτταρική μεμβράνη	16
1.3.2. Εξωγενείς πηγές	17
1.4. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	17
1.4.1. DNA	19
1.4.2. Πρωτεΐνες.....	19
1.4.3. Λιπίδια.....	20
1.5. Οξειδωτικό στρες	21
1.6. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	22
1.6.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί	23
1.6.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί	25
1.7. Ελιά.....	28
1.7.1. Ιστορία της ελιάς	29
1.7.2. Οικονομικά στοιχεία	30
1.7.3. Μορφολογία ελαιόδεντρου και ελαιόκαρπου	31
1.7.4. Συνθήκες καλλιέργειας.....	32
1.7.5. Terroir	33
1.8. Σύσταση του ελαιόκαρπου	34
1.9. Ποικιλία «Κορωνέικη»	37
1.10. Ποικιλία «Αθηνολιά»	38

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	39
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.1. Όργανα και Υλικά	40
3.2. Μέθοδοι	41
3.2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων	41
3.2.2. Κυτταροκαλλιέργεια	41
3.2.2.1. Κυτταρική σειρά “ΜΚΝ-45”	41
3.2.2.2. Συνθήκες καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς “ΜΚΝ-45”	42
3.2.3. Μέθοδος ΧΤΤ - Προσδιορισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης δειγμάτων ελιάς σε καρκινικά κύτταρα “ΜΚΝ-45”	43
3.2.4. Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry) - Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε καρκινικά κύτταρα “ΜΚΝ-45”	46
3.2.5. Προετοιμασία των κυττάρων για τον προσδιορισμό του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS	49
3.2.6. Μέθοδος Bradford - Προσδιορισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης	49
3.2.7. Μέθοδος TBARS - Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ	51
3.2.8. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1. Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων	54
4.2. Εκτίμηση επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής	58
4.3. Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)	63
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ελαιόδεντρο αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της οικονομίας και του πολιτισμού της περιοχής της Μεσογείου. Τα κύρια προϊόντα του, τόσο η βρώσιμη ελιά όσο και το ελαιόλαδο, έχουν συνδεθεί με μία ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή. Τα εκχυλίσματα προϊόντων και υπο-προϊόντων ελιάς περιέχουν διάφορα βιοδραστικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινόλων, με αντιοξειδωτικές και αντι-καρκινικές ιδιότητες, γεγονός που έχει πυροδοτήσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη τους σε κυτταρικό επίπεδο. Τα πιο καλά μελετημένα είναι τα εκχυλίσματα της ελαιώδους φάσης του ελαιόκαρπου ή του ελαιόλαδου, με τα υδατικά εκχυλίσματα ελαιόκαρπου να έχουν εξεταστεί πολύ λιγότερο.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοδραστικότητας της υδατικής φάσης ελαιόκαρπων, των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Αθηνολιά», σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση αυξανόμενων μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων υδατικών φάσεων στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και στον δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν ως προς το υψόμετρο και ως προς την πραγματοποίηση ή όχι αρδευτικής διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα των υδατικών φάσεων ελιάς των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Αθηνολιά», τόσο οι ξηρικές όσο και οι ποτιστικές, παρουσιάζουν πιθανώς αντι-καρκινική δράση. Ωστόσο, στην ποικιλία «Κορωνέικη», η ποτιστική ήταν αυτή που εκδήλωσε ξεκάθαρη αντι-καρκινική δράση, ενώ στην ποικιλία «Αθηνολιά» φάνηκε ότι οι παράγοντες, ξηρασία και υψόμετρο, δεν επηρεάζουν σημαντικά στη βιοδραστικότητα των υδατικών φάσεων. Συγκρίνοντας τις δύο ποικιλίες, φάνηκε ότι η «Αθηνολιά» ήταν περισσότερο δραστική, απ'ότι η «Κορωνέικη». Βέβαια η αντι-καρκινική δράση των εκχυλισμάτων αυτών θα πρέπει να εξακριβωθεί με περισσότερα πειράματα σε μη καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε πειραματόζωα.

Λέξεις - Κλειδιά: υδατικό εκχύλισμα ελαιόκαρπου, πολυφαινόλες, γλουταθειόνη, δραστικές μορφές οξυγόνου, λιπιδική υπεροξειδωση

ABSTRACT

The olive tree is an integral element of the economy and culture of the Mediterranean region. Its main products, both edible olive and olive oil, have been correlated with a healthy and balanced diet. Extracts of olive products and by-products contain various bioactive molecules, including polyphenols, with antioxidant and anti-cancer properties, which has sparked research interest in their study at cellular level. Oil phase extracts of the olive fruit and olive oil extracts are the most studied, whereas aqueous extracts of the olive fruit are much less investigated.

The aim of this study was to assess the bioactivity of aqueous phase of olives, from "Koroneiki" and "Athinolia" varieties, on gastric cancer cells. Specifically, it was investigated the effect of increasing non-cytotoxic concentrations of aqueous phases on the levels of reduced glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) and the index of lipid peroxidation. Interestingly, the samples that were examined differed in altitude and in irrigation process.

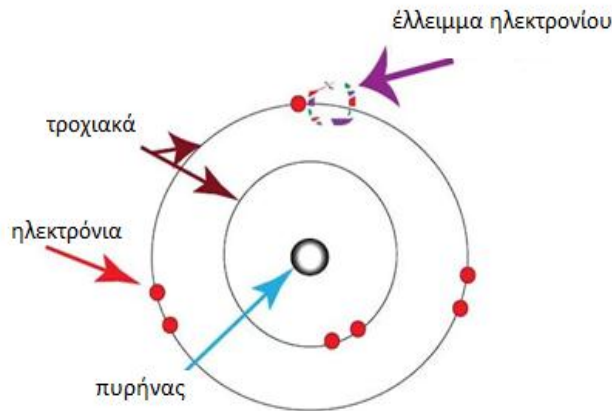
According to the results, it was concluded that all four samples of the aqueous phases of olives, "Koroneiki" and "Athinolia", both dry and irrigated, exhibit potential anti-cancer activity. However, in the "Koroneiki" variety, the irrigated one manifested clear anti-cancer effect, while in the "Athinolia" variety it was shown that drought and altitude, do not significantly affect the bioactivity of the aqueous phases. Comparing these two varieties, it was deduced that "Athinolia" was more effective than "Koroneiki". It has to be noted that the anti-cancer effects of these extracts should be established after more experiments on non-cancer cell lines and experimental animals.

Keywords: aqueous olive fruit extract, polyphenols, glutathione, reactive oxygen species, lipid peroxidation

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Είναι γνωστό ότι τα ηλεκτρόνια σθένους είναι εκείνα που καθορίζουν τη συμπεριφορά των χημικών στοιχείων. Τα σταθερά μόρια διαθέτουν έναν συγκεκριμένο αριθμό ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα, τα οποία βρίσκονται διατεταγμένα σε ζεύγη. Όταν όμως ένα ηλεκτρόνιο απορροφήσει ενέργεια και απομακρυνθεί, τότε το δεύτερο ηλεκτρόνιο, με το οποίο αποτελούσαν πριν ένα ζεύγος, μένει ασύζευκτο. Κάθε άτομο ή σύνολο ατόμων που διαθέτει τουλάχιστον ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, ονομάζεται *ελεύθερη ρίζα*. Αντίστοιχα, μία ρίζα μπορεί να δημιουργηθεί και με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Το ασύζευκτο αυτό ηλεκτρόνιο προσδίδει έναν σημαντικό βαθμό δραστηριότητας στο μόριο, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα ασταθές (Gutowski & Kowalczyk, 2013).



Εικόνα 1: Η δομή μίας ελεύθερης ρίζας

Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να αντιδρούν με άλλα μόρια και να τους αποσπούν ηλεκτρόνια προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα. Ονομάζονται λοιπόν οξειδωτικά μόρια, αφού προκαλούν οξείδωση στο περιβάλλον τους, αλλά τα ίδια υφίστανται αναγωγή. Αυτή η ανταλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ριζών κάθε φορά

(Ali Pambuk, 2018). Μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να είναι είτε ηλεκτρικά φορτισμένη (θετικά ή αρνητικά), είτε ηλεκτρικά ουδέτερη. Όσον αφορά το ελεύθερο ηλεκτρόνιο, σύμφωνα με τον Βρετανό Χημικό F. S. Dainton, αυτό θεωρείται από τους επιστήμονες ως η πιο απλή χημική οντότητα που υπάρχει και ως το πιο ισχυρό αναγωγικό μέσο, αφού ανταλλάσσεται μεταξύ των μορίων που συμμετέχουν σε μία χημική αντίδραση οξειδοαναγωγής (Dainton, 1967).

1.2. Κατηγορίες ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες ανάλογα με το άτομο που περιλαμβάνουν στον χημικό τους τύπο μπορεί να ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), στις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), στις δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS) και τις δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCIS), με τις τρεις τελευταίες κατηγορίες να παράγονται μετά από αντιδράσεις με τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 2007). Εντούτοις, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτελούν το πιο σημαντικό είδος ελευθέρων ριζών που παράγεται σε έναν ζωντανό οργανισμό (Valko et al., 2006).

Στις *δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)* ανήκουν ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, όπως είναι η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$), υδροπεροξυλίου ($HO_2^{\cdot}$), περοξυλίου ($ROO^{\cdot}$) και αλκοξυλίου ($RO^{\cdot}$), αλλά και μη ρίζες, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονήρες οξυγόνο (1O_2), το όζον (O_3), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) και το υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$). Οι μη ρίζες μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε δραστικές ελεύθερες ρίζες (Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021).

Στις *δραστικές μορφές αζώτου (RNS)* ανήκουν οι ρίζες μονοξειδίου του αζώτου ($NO^{\cdot}$) και διοξειδίου του αζώτου ($NO_2^{\cdot}$), αλλά και μη ρίζες, δηλαδή το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($OONO^-$), το κατιόν νιτροσυλίου (NO^+), το ανιόν νιτροσυλίου (NO^-), το νιτρώδες χλωρίδιο (NO_2Cl) και το τριοξείδιο του διαζώτου (N_2O_3) (AG et al., 2020).

Γενικότερα οι ROS και οι RNS αλληλεπιδρούν χημικά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υβριδικών δραστικών μορφών. Αξίζει να αναφερθεί ότι μία

τέτοιου είδους αλληλεπίδραση μπορεί να μετατρέψει μία μη δραστική μορφή σε δραστική. Τέλος, η δραστικότητα τους, δηλαδή η ικανότητα τους να αντιδρούν χημικά με γειτονικά μόρια διαφέρει από είδος σε είδος, και όσο μεγαλύτερη είναι αυτή, τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος ημιζωής τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο αποτελεί μία όχι ιδιαίτερα δραστική μορφή οξυγόνου που μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις, αφού ο χρόνος ημιζωής της είναι μεγάλος. Το αντίθετο συμβαίνει με τη ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$), που είναι μία πολλή δραστική ρίζα (Bashan et al., 2009).

1.3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στον οργανισμό τόσο κάτω από φυσιολογικές (ενδοκυτταρικές πηγές) όσο και κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες (εξωκυτταρικές πηγές).

1.3.1. Ενδογενείς πηγές

Η πρώτη περίπτωση αφορά τις *ενδοκυτταρικές πηγές* παραγωγής, καθώς οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, η έκφραση γονιδίων, η απόπτωση και οι προσαρμογές του οργανισμού κατά τη διάρκεια της άσκησης (Goutzourelas et al., 2014).

Σημαντικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι διάφορα κυτταρικά συστήματα, όπως είναι το *κυτταρόπλασμα*, τα *μιτοχόνδρια*, τα *υπεροξειδιοσώματα*, το *ενδοπλασματικό δίκτυο* και οι *κυτταρικές μεμβράνες*.

1.3.1.1. Κυτταρόπλασμα

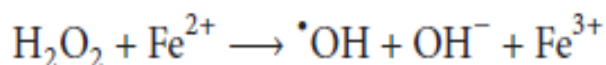
Το πιο σημαντικό κυτταροπλασματικό ένζυμο που οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) είναι η οξειδάση της ξανθίνης (XO). Στην περίπτωση των υγιών ιστών, η δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) καταλύει την οξειδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα το NADP^+ ως δέκτη ηλεκτρονίων. Αντίθετα, σε κατεστραμμένους ιστούς, το ένζυμο αυτό μετατρέπεται από την ανηγμένη στην οξειδωμένη μορφή του, μεταφέροντας παράλληλα ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο και οδηγώντας στην παραγωγή της ρίζας σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (di Meo et al., 2016).

1.3.1.2. Μιτοχόνδρια

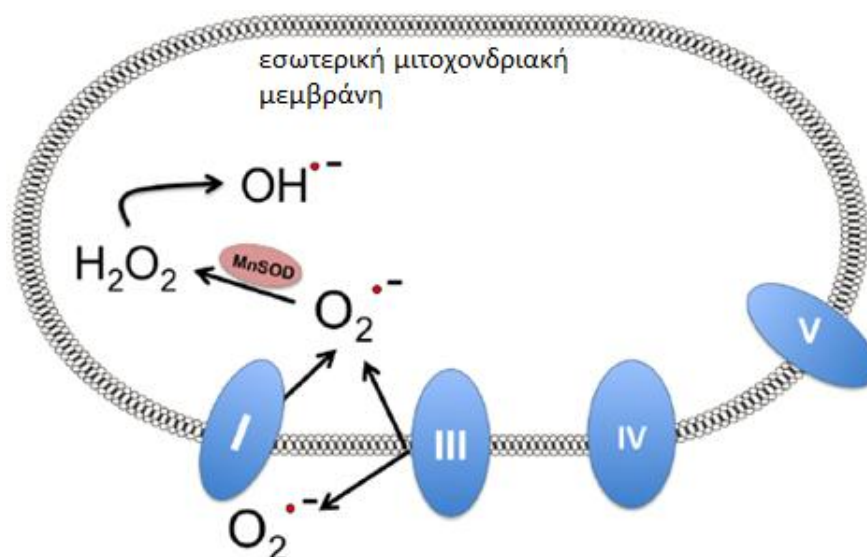
Η μεγαλύτερη ποσότητα των ελευθέρων ριζών παράγεται στα μιτοχόνδρια μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται “οξειδωτική φωσφορυλίωση”. Ο στόχος της βιοχημικής αυτής διαδικασίας είναι η οξείδωση θρεπτικών συστατικών της διατροφής για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Έτσι, τα αερόβια κύτταρα παράγουν το σουπεροξειδικό ανιόν ($\text{O}_2^{\cdot-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και τη ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}^{\cdot}$), ως προϊόντα της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (O_2).

Αναλυτικότερα, στα μιτοχόνδρια, μέσω του κύκλου του Krebs, παράγονται τα NADH και FADH_2 , τα οποία μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Τα ηλεκτρόνια αυτά, στη συνέχεια, μεταφέρονται στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα την αναγωγή του, και τελικά την μετατροπή του σε H_2O . Ωστόσο, όταν η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου είναι ημιτελής, τότε σχηματίζεται η σουπεροξειδική ρίζα ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών. Τα σημαντικότερα σημεία σχηματισμού της ρίζα αυτής είναι το σημείο FMN του συμπλέγματος I και ο κύκλος Q του συμπλέγματος III. Το $\text{O}_2^{\cdot-}$ μετατρέπεται εύκολα από την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) σε H_2O_2 , το οποίο ακολούθως μετασχηματίζεται σε H_2O μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) (Nickel et al., 2014). Επιπρόσθετα, παρουσία μετάλλων όπως ο σίδηρος (Fe) και ο χαλκός (Cu), το H_2O_2 μετατρέπεται μέσω της

αντίδρασης Haber-Weiss και Fenton, στην πολύ δραστική ρίζα υδροξυλίου $\text{OH}^\bullet$, όπως φαίνεται παρακάτω (di Meo et al., 2016).



Τέλος, σε υποξικές συνθήκες, παράγεται, από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, μονοξειδίο του αζώτου (NO), που δύναται να οδηγήσει στη δημιουργία δραστικών μορφών αζώτου (RNS) (Reuter et al., 2010).

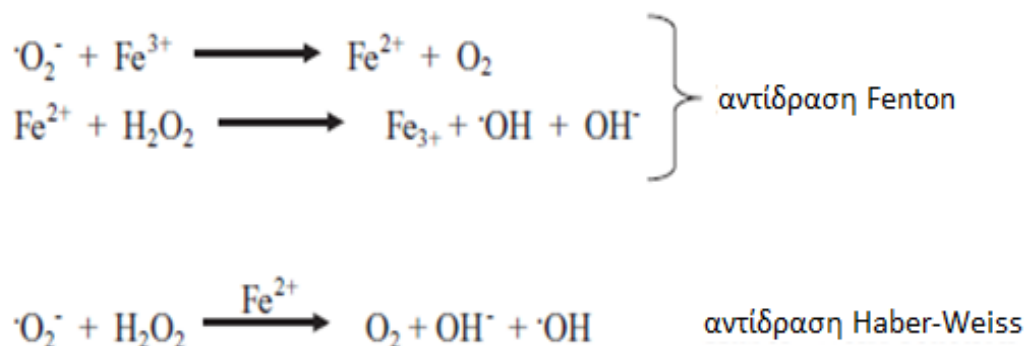


Εικόνα 2 : Παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια (Watts et al., 2013)

1.3.1.3. Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), στην οξείδωση των λιπαρών οξέων και στη σύνθεση λιπιδικών ενώσεων, με τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές να οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Επιπλέον περιέχουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης (XO) και τη συνθετάση του νιτρικού οξέος (NOS), που προκαλούν την παραγωγή ($\text{O}_2^{\bullet -}$) και ($\text{NO}^\bullet$), αντίστοιχα. Ακολούθως, οι ρίζες αυτές αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν

το δραστικό ανιόν $\text{OONO}^\cdot$. Επιπρόσθετα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss και Fenton, ανάμεσα στο $\text{O}_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 , σχηματίζεται η εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου $\text{OH}^\cdot$, (di Meo et al., 2016).



Εικόνα 3 : Η αντίδραση Fenton και Haber-Weiss που οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου (Henkel, 2010)

1.3.1.4. Ενδοπλασματικό δίκτυο

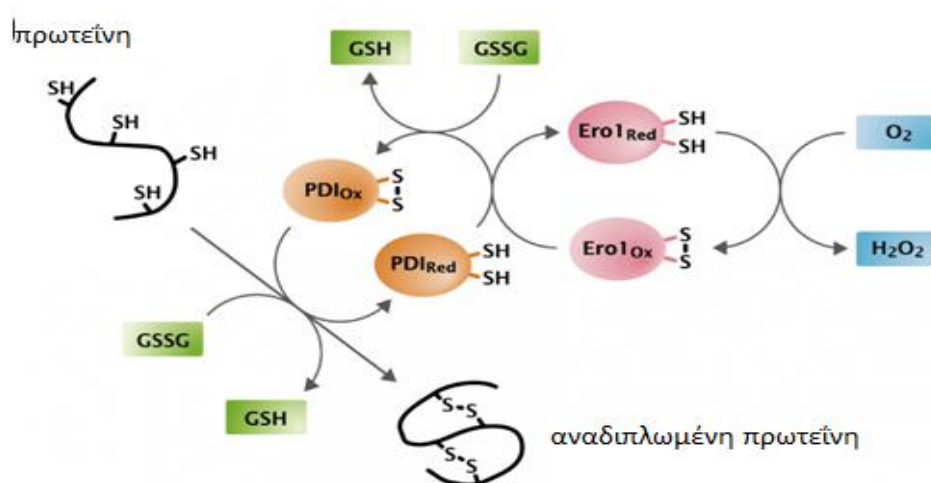
Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι ένα κυτταρικό σύστημα που εμπλέκεται σε ποικίλες λειτουργίες όπως είναι η σύνθεση, η αναδίπλωση και η μεταφορά πρωτεϊνών, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και, σε μερικούς τύπους κυττάρων, η αποτοξικοποίηση ουσιών.

Όσον αφορά τον μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών, είχε αποδειχτεί από τους Gillette et al. (1957) ότι οι μεμβράνες του ER αποτελούν πηγή H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot-}$ και σε αυτό εμπλέκεται το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 (CYPs).

Επιπρόσθετα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, για τη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, το κυτόχρωμα b5 λειτουργεί ως φορέας ηλεκτρονίων με δύο τρόπους δράσης. Σε μία από αυτές, το κυτόχρωμα b5 μεταφέρει ηλεκτρόνια από τη NADH-αναγωγή του κυτοχρώματος b5 στη δεσатуράση, η οποία δημιουργεί διπλούς δεσμούς άνθρακα στα λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας ένα μόριο O_2 και παράγοντας δύο μόρια H_2O . Είναι γνωστό ότι το κυτόχρωμα b5, ενδεχομένως, συμμετέχει θετικά στην οξειδωση των ξеноβιοτικών ουσιών. Αναλυτικότερα, μεταφέρει το ένα από τα δύο ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα P-450 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον πιο γρήγορο σχηματισμό των προϊόντων H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot-}$ (di

Meo et al., 2016). Μάλιστα, ανακαλύφθηκε πρόσφατα, μία επιπρόσθετη πηγή σουπεροξειδικής ρίζας, αφού αποδείχτηκε ότι η NADH-αναγωγή του κυτοχρώματος b5 μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της $O_2^{\cdot-}$ (Samhan-Arias & Gutierrez-Merino, 2014).

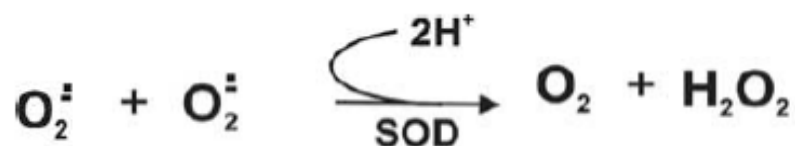
Τέλος, οι περισσότερες πρωτεΐνες που παράγονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σταθεροποιούνται μέσω του σχηματισμού ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών (-S-S-), μετά από οξείδωση των σουλφυδρυλομάδων τους (SH), δηλαδή υφίστανται αναδίπλωση. Η πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση (PDI) είναι ένα απαραίτητο ένζυμο που συμμετέχει στον σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών, αφού δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στα κατάλοιπα κυστεΐνης που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο της PDI, με αποτέλεσμα την αναγωγή της PDI και την οξείδωση του υποστρώματος (πρωτεΐνης). Στην αναγέννηση της οξειδωμένης μορφής της PDI συμβάλλει η οξειδορεδοκτάση-1 (ERO1), η οποία τελικά οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και συγκεκριμένα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Zeeshan et al., 2016). Έχει αποδειχτεί ότι περίπου το 25% των ROS παράγονται μέσω της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες με πολλούς δισουλφιδικούς δεσμούς συμμετέχουν περισσότερο στην παραγωγή ROS σε σχέση με τις πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν πολλούς (Tu & Weissman, 2004).



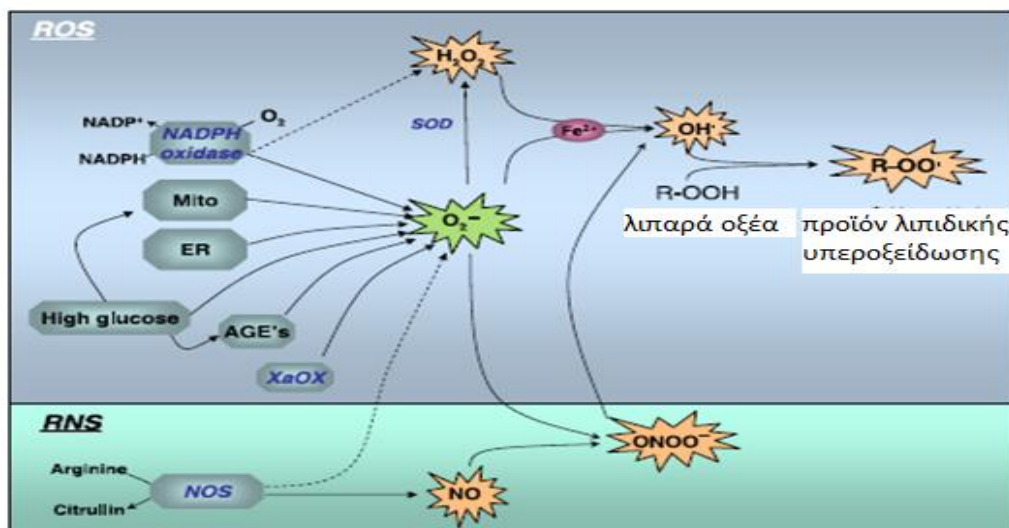
Εικόνα 4 : Πρωτεϊνική αναδίπλωση στο ER και παραγωγή ROS

1.3.1.5. Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα σημείο του κυττάρου που εμπλέκεται στις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών, αφού βρίσκεται συνεχώς εκτεθειμένη σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον. Η βασικότερη πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στις μεμβράνες είναι η δράση του ενζύμου NADPH-οξειδάση που οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Συγκεκριμένα, στη περίπτωση των φαγοκυττάρων, η σουπεροξειδική ρίζα που παράγεται συμβάλλει στην προστασία από βακτήρια. Αυτό συμβαίνει αφού η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ μετατρέπεται, μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε H_2O_2 , το οποίο αποτελεί πρόδρομο διάφορων βακτηριοκτόνων ROS, όπως είναι το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Vermot et al., 2021).



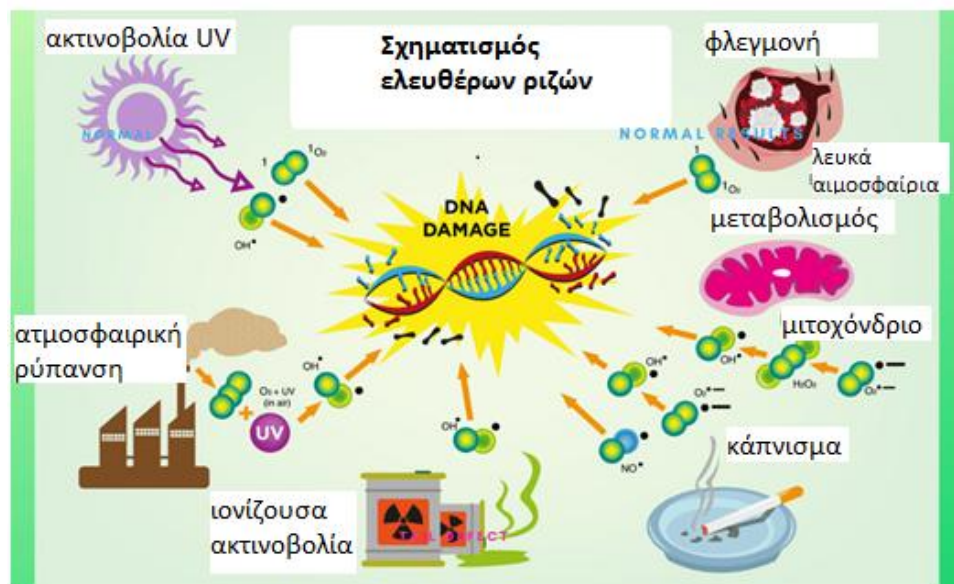
Εικόνα 5 : Η παραγωγή του H_2O_2 από την σουπεροξειδική ρίζα (Bukowska et al., 2006)



Εικόνα 6 : Οι κυριότερες πηγές παραγωγής των σημαντικότερων ROS και RNS (ER: ενδοπλασματικό δίκτυο, Mito: μιτοχόνδρια, XaOX: οξειδάση της ξανθίνης, AGE's: τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης) (Bashan et al., 2009)

1.3.2. Εξωγενείς πηγές

Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει τις *εξωκυτταρικές* πηγές παραγωγής, δηλαδή τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να παραχθούν εξαιτίας ελλειμματικής ή ανθυγιεινής διατροφής, καπνίσματος και έκθεσης σε ιονίζουσα ή υπεριώδη ακτινοβολία (Goutzourelas et al., 2014). Επιπλέον, άλλες αιτίες δημιουργίας τους είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, τα βιομηχανικά χημικά, η καύση οργανικής ύλης ή η πρόκληση φλεγμονής, με την τελευταία περίπτωση, να μπορεί βέβαια να κατηγοριοποιηθεί και στις ενδογενείς πηγές (AG et al., 2020).



Εικόνα 7 : Ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές πηγές σχηματισμού ελευθέρων ριζών

1.4. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες, που αποτελούν μία φυσιολογική απόρροια του αερόβιου μεταβολισμού, συντίθενται, μέσα από βασικές λειτουργίες ενός οργανισμού, σε αποδεκτές ποσότητες και η συγκέντρωσή τους ρυθμίζεται από τη δράση αντιοξειδωτικών μορίων. Δεδομένου ότι η ισορροπία, ανάμεσα στα προοξειδωτικά και στα αντιοξειδωτικά μόρια, διατηρείται, οι ρίζες έχουν

πολύ σημαντική θετική επίδραση στη διαδικασία φαγοκυττάρωσης ή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Zahra et al., 2021). Επιπλέον ισχυροποιούν τους βιολογικούς μηχανισμούς άμυνας εναντίον μολύνσεων ή φλεγμονής που μπορεί να προκληθεί από έντονη άσκηση, δηλαδή μυϊκό τραυματισμό (Li et al., 2015).

Ωστόσο, παρά τη θετική τους επίδραση σε μικρές ποσότητες, η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι υπεύθυνη για την οξειδωτική βλάβη των μακρομορίων και του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας λοιπόν σε μία δυσχερή παθολογική κατάσταση (Goutzourelas et al., 2014). Λόγω της υψηλής τους δραστηριότητας, μπορούν να αλληλεπιδράσουν χημικά με βιολογικά μόρια, όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια και να οδηγήσουν σε αλλαγή της κυτταρικής λειτουργίας και τελικά κυτταρικό θάνατο. Άλλωστε είναι ευρέως γνωστό ότι η υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι υπεύθυνη για πολλές ασθένειες, όπως είναι το Αλτσχάιμερ, το Πάρκινσον και η επιτάχυνση της γήρανσης (Gandhi & Abramov, 2012).

Συμμετοχή των ROS/RNS σε φυσιολογικές διαδικασίες

- Ρύθμιση αγγειακού ρυθμού
- Ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης
- Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
- Διαμεσολάβηση σε σηματοδοτικά μονοπάτια

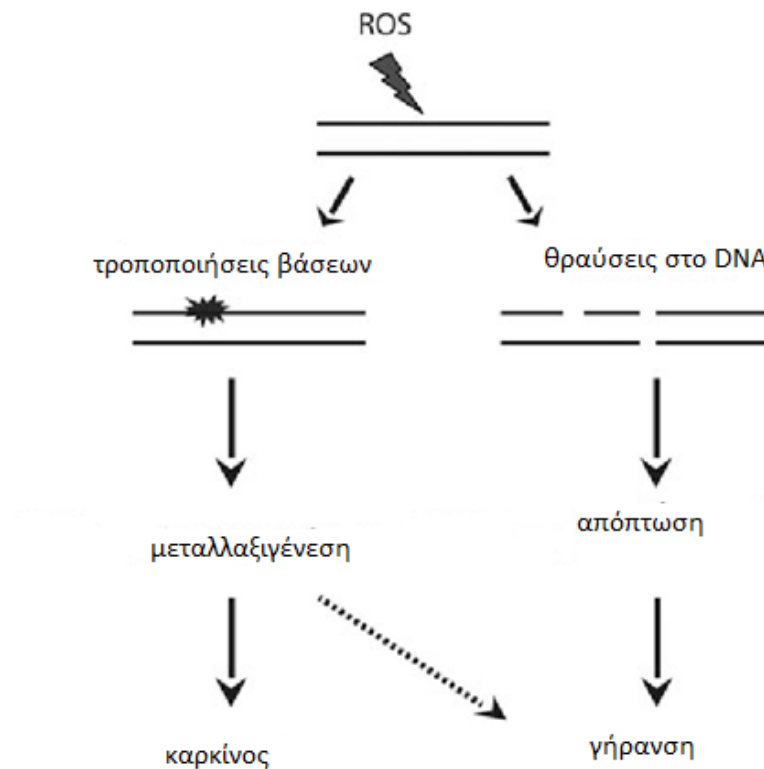
Συμμετοχή των ROS/RNS σε παθολογικές καταστάσεις

- Γήρανση
- Αθηροσκλήρωση
- Νευροδιαβιβαστικές ασθένειες
- Ρευματοειδής αρθρίτιδα
- Ισχαιμικό επεισόδιο
- Αποφρακτική υπνική άπνοια
- Παχυσαρκία και διαβήτης
- Πρόκληση κακοήθειας

Εικόνα 8 : Η συμμετοχή των ROS και RNS σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Bashan et al., 2009)

1.4.1. DNA

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβη στα νουκλεϊνικά οξέα με ποικίλους τρόπους, όπως θραύσεις στις έλικες, σύνδεση του DNA με πρωτεΐνες και τροποποιήσεις στις πουρίνες και στις βάσεις του, με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων (Gandhi & Abramov, 2012).



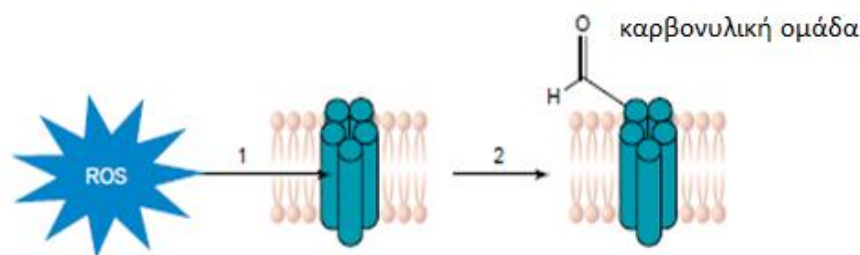
Εικόνα 9 : Η επίδραση των ROS στο DNA (Charitou & Burgering, 2013)

1.4.2. Πρωτεΐνες

Συνέπεια της έκθεσης των πρωτεϊνών στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι η τροποποίηση των αμινοξέων στις πλευρικές αλυσίδες, που έχει ως συνέπεια την αλλαγή της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας, διαταράσσοντας έτσι τον κυτταρικό μεταβολισμό. Συγκεκριμένα, κατά την οξείδωση τους, δημιουργούνται καρβονυλικές (C=O) ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) στις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών και κυρίως στην προλίνη, αργινίνη, λυσίνη και θρεονίνη. Επιπρόσθετα, οι καρβονυλικές ομάδες, μπορούν να προκύψουν μετά από αντίδραση των πυρηνόφιλων πλευρικών αλυσιδών της κυστεΐνης, της ιστιδίνης και της λυσίνης με αλδεΐδες που

παρήχθησαν κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση. Έχει βρεθεί ότι το αμινοξύ “κυστεΐνη (Cys)” είναι περισσότερο επιρρεπές στην οξείδωση από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Ahmad et al., 2017). Ο σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων αποτελεί σημαντικό δείκτη πρωτεϊνικής οξείδωσης και χρησιμοποιείται για την διαπίστωση του (Butterfield et al., 2001).

Έχει παρατηρηθεί ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών συνδέεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως νευροδιαβιβαστικές ασθένειες, διαβήτης, αθηροσκλήρωση και γήρανση (Ahmad et al., 2017).



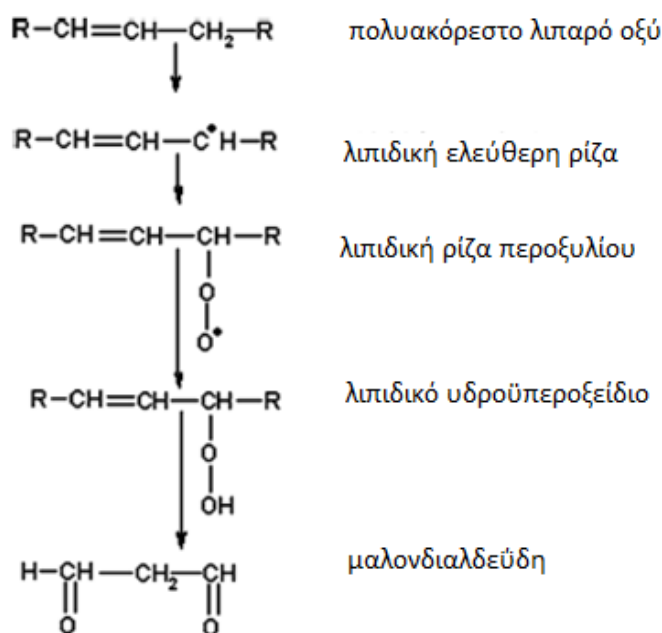
Εικόνα 10 : Η αλληλεπίδραση των ROS με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών και η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Butterfield et al., 2001)

1.4.3. Λιπίδια

Μία πολύ σημαντική επίπτωση των ελευθέρων ριζών είναι η *λιπιδική υπεροξειδωση*, η οποία αφορά την αλυσιδωτή οξειδωτική αποδόμηση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και τελικά την πρόκληση βλάβης στα κύτταρα του οργανισμού. Αναλυτικότερα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), που αποτελούν δομικό στοιχείο των κυτταρικών μεμβρανών, οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δραστικών αλδεϋδών, όπως είναι η μηλονική διαλδεϋδη (MDA). Είναι γνωστό ότι η μαλονδιαλδεϋδη παράγεται φυσιολογικά στους οργανισμούς κατά τη διάρκεια πολλών διεργασιών, αλλά η ύπαρξη ελευθέρων ριζών οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσής της, καθιστώντας την έτσι σημαντικό βιοδείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. (Ligor et al., 2012).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) στις φωσfolιπιδιακές στρώσεις των κυτταρικών μεμβρανών είναι υπεύθυνα για την ρευστότητα των μεμβρανών. Σημαντική επίδραση σε αυτό έχει η λιπιδική υπεροξειδωση, η

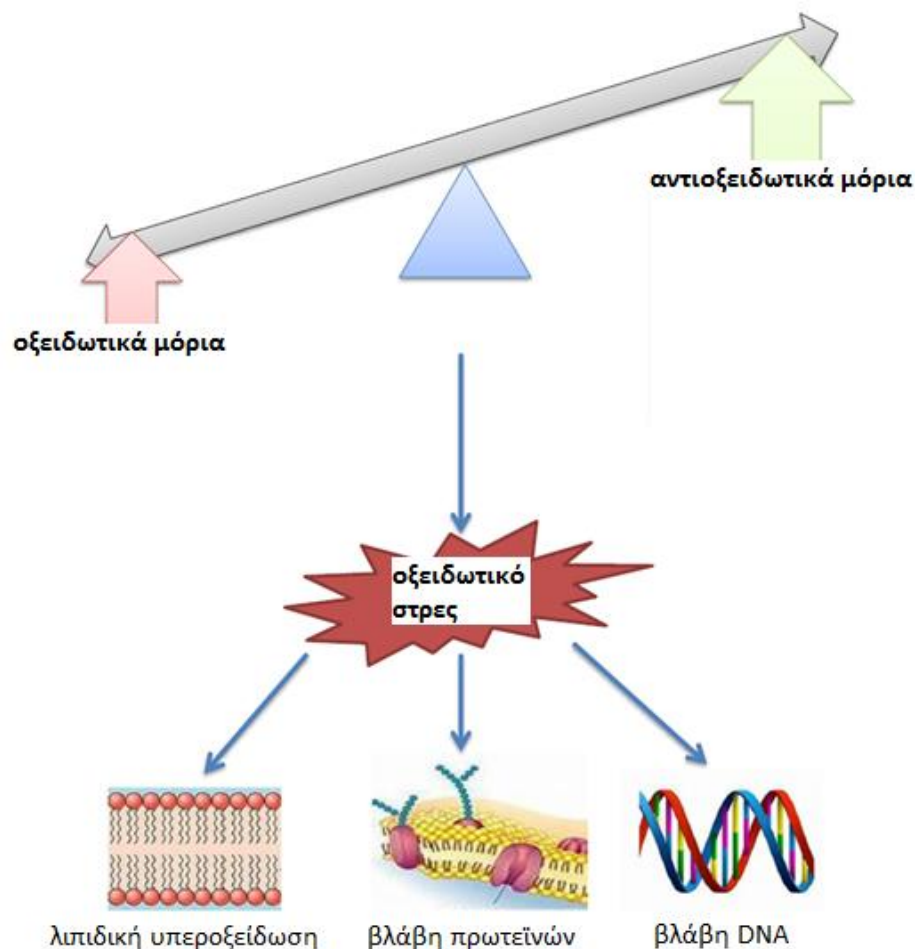
οποία μειώνει την ρευστότητα τους και επηρεάζει τις ιδιότητες τους. Επιπρόσθετα, τα αλδεϋδικά προϊόντα που προκύπτουν από την διαδικασία αυτή, είναι ικανά να επηρεάσουν ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η μετάδοση σήματος, η έκφραση γονιδίων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η απόκριση των κυττάρων-στόχων (Wadhwa et al., 2012).



Εικόνα 11 : Σχηματισμός της MDA από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (Ligor et al., 2012)

1.5. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία δυσμενής κατάσταση, στην οποία επέρχεται ένας οργανισμός, και ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, δηλαδή οξειδωτικών μορίων, και στην εξάλειψή τους από προστατευτικούς μηχανισμούς που προκαλούν αναγωγή, δηλαδή τα αντιοξειδωτικά μόρια. Η ανισορροπία αυτή έχει ως επακόλουθο την πρόκληση βλάβης σε σημαντικά κυτταρικά βιομόρια, όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια και τελικά σε ολόκληρο τον οργανισμό (Reuter et al., 2010).

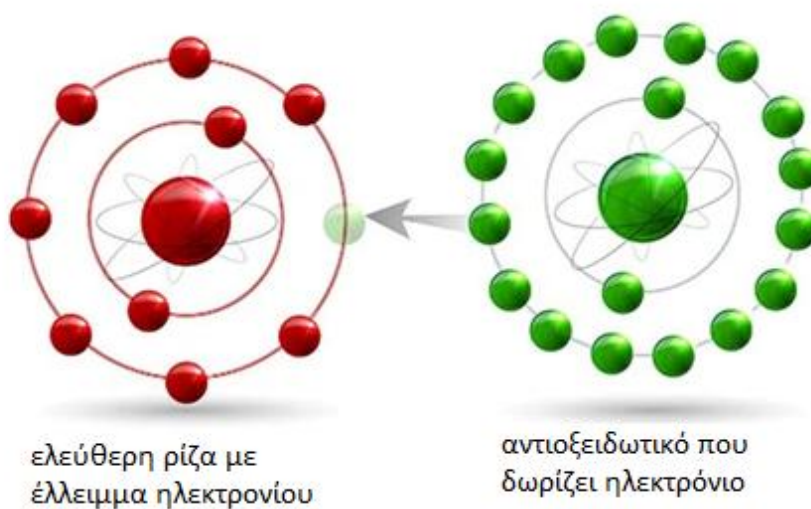


Εικόνα 12 : Η οξειδοαναγωγική ισορροπία και το οξειδωτικό στρες σε έναν ζώντα οργανισμό (Akhigbe & Ajayi, 2021)

1.6. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Σύμφωνα με τους Tang και Halliwell, ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται κάθε ουσία η οποία είτε επιβραδύνει, προλαμβάνει και καταστέλλει τη δημιουργία ενός τοξικού οξειδωτικού μορίου είτε εξουδετερώνει τα ήδη υπάρχοντα οξειδωτικά μόρια προσφέροντας σε αυτά τα δικά τους ηλεκτρόνια. Έτσι παρεμποδίζονται οι επικίνδυνες αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από αυτά (Tang & Halliwell, 2010). Καθίσταται σαφές πως η επίδραση που έχουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στις ελεύθερες ρίζες τους ανακηρύσσουν σημαντικούς μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Zahra et al., 2021). Παρόλα αυτά, από το σύνολο των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), μόνο η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) είναι τόσο

δραστική, κάνοντας έτσι δύσκολη την αποτελεσματική απενεργοποίηση της (Boukhenouna et al., 2018).



Εικόνα 13 : Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών μορίων

Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται στα *ενζυμικά* και στα *μη ενζυμικά* αντιοξειδωτικά (Zahra et al., 2021).

1.6.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ανήκουν ενδογενή ένζυμα, όπως είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR) (Zahra et al., 2021).

Η *υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά, το οποίο απομονώθηκε το 1939, αλλά η αντιοξειδωτική του δράση αποδείχτηκε αρκετά αργότερα, το 1969, από τους McCord και Fridovich. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση μετατροπής της ρίζας σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε μοριακό οξυγόνο (O_2) και στο λιγότερο

δραστικό είδος, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (Valko et al., 2006).

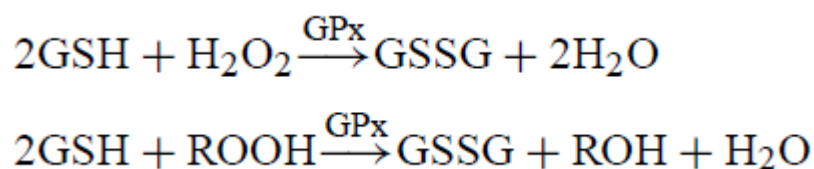
Η καταλάση (CAT) εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό στο ήπαρ, στα ερυθροκύτταρα και στους πνεύμονες και εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα. Το ένζυμο αυτό προάγει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και μοριακό οξυγόνο (O_2) (Zahra et al., 2021).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) παίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Συγκεκριμένα αποτελούν μηχανισμό άμυνας των ερυθροκυττάρων, εναντίον της βλάβης που προκαλείται από τη λιπιδική υπεροξειδωση (Shah et al., 2014). Τα δύο αυτά ένζυμα συμμετέχουν στην αναγέννηση της γλουταθειόνης (GSH), η οποία μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από το στοιχείο Σελήνιο (Se) και απαντάται στον εξωκυττάριο χώρο, στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής οργανικών υδροϋπεροξειδίων ($ROOH$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) ή αλκοόλη (ROH). Ταυτόχρονα χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οποία λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και οξειδώνεται στην GSSG.

Παρόλο που η δράση της είναι όμοια με αυτήν της καταλάσης (CAT), η GPx ενεργοποιείται όταν το υπεροξειδίο του υδρογόνου βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η καταλάση όταν αυτό βρίσκεται σε συγκέντρωση πάνω από το φυσιολογικό. Έτσι η CAT δεν περιορίζει ολόκληρη την ποσότητα του H_2O_2 , με αποτέλεσμα να θεωρείται λιγότερο δραστική από την GPx (Zahra et al., 2021).



Εικόνα 14 : Ο μηχανισμός δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) (Valko et al., 2006)

Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH, έχοντας ως στόχο την διατήρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης σε φυσιολογικά επίπεδα στο εσωτερικό του κυττάρου (Horn et al., 2018). Παράλληλα χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το φλαβινο-αδενινωδινουκλεοτίδιο (FAD), το οποίο ανάγεται από το νικοτιναμιδο-αδενινωδινουκλεοτίδιο (NADPH), με αποτέλεσμα το δεύτερο να οξειδώνεται. (Hegeman, A.D., & Frey, P.A., 2007).



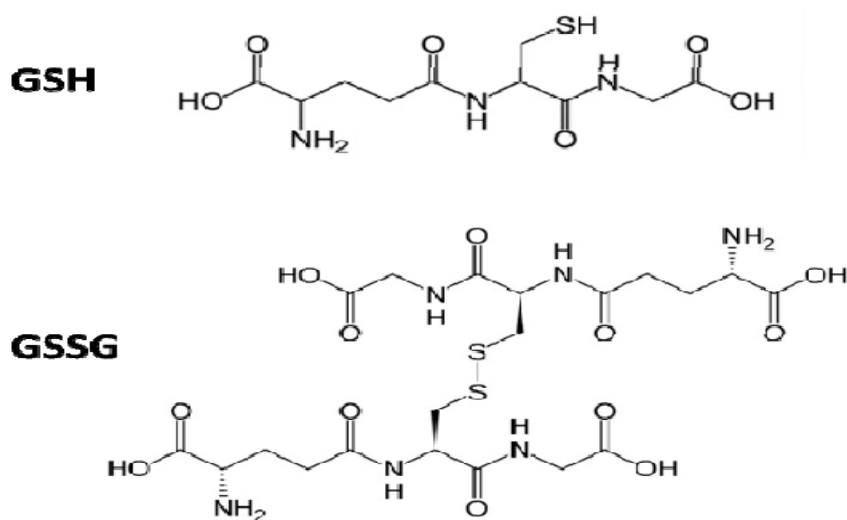
Εικόνα 15 : Ο μηχανισμός δράσης της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR) (Horn et al., 2018)

1.6.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Το σημαντικότερο μόριο που ανήκει στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μορίων περιλαμβάνονται η γλουταθειόνη (GSH).

Η γλουταθειόνη αποτελεί την πιο άφθονη, μη πρωτεϊνική θειόλη, μικρού μοριακού βάρους, που περιέχεται στα κύτταρα. Είναι ένα τριπεπτίδιο, που δομείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Η ανηγμένη μορφή της (GSH), αντιδρά απευθείας με τις ελεύθερες ρίζες, ιδιαίτερα τη ρίζα σουπεροξειδίου, τη ρίζα υδροξυλίου, το μονοξείδιο του αζώτου και τις

ανθρακικές ρίζες και τις εξουδετερώνει. Επιπρόσθετα, εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και μετατρέπεται συνεχώς από την οξειδωμένη μορφή της (GSSG) στην ανηγμένη και το αντίστροφο (Gandhi & Abramov, 2012). Επομένως, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και τη ρύθμιση της φυσιολογικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Είναι γνωστό ότι σε υγιή κύτταρα, περισσότερο από το 90% της συνολικής γλουταθειόνης απαντάται στην ανηγμένη μορφή της (GSH) και λιγότερο από 10% στην οξειδωμένη (GSSG). Η αναλογία GSH/GSSG αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο για την διαπίστωση ύπαρξης οξειδωτικού στρες σε έναν οργανισμό και σχετίζεται με την εμφάνιση ασθενειών (Shah et al., 2014). Επιπλέον έχει αποδειχτεί ότι η ελάττωση της ποσότητας της GSH στα κύτταρα, τα καθιστά πιο ευαίσθητα στην οξειδωτική βλάβη, ενώ η πλήρωση των μιτοχονδρίων με την γλουταθειόνη, δρα προστατευτικά (Bashan et al., 2009).



Εικόνα 16 : Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (Bertoni et al., 2019)

Άλλα μόρια που ανήκουν στην ίδια κατηγορία είναι η *βιταμίνη C*, η *βιταμίνη E*, το άλφα-λιποϊκό οξύ (ALA), το *σελήνιο*, το *β-καροτένιο*, το *συνένζυμο Q-10* και το *ουρικό οξύ* (Zahra et al., 2021).

Η *βιταμίνη C* (ασκορβικό οξύ), υδατοδιαλυτή και η *βιταμίνη E*, λιποδιαλυτή, αλληλεπιδρούν στις κυτταρικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες, προκειμένου να αναγεννήσουν την α-τοκοφερόλη, από τις

ρίζες στις οποίες έχει μετατραπεί.

Το *άλφα-λιποϊκό οξύ (ALA)* είναι τόσο υδατοδιαλυτό όσο και λιποδιαλυτό μόριο, με αποτέλεσμα να διανέμεται και στις κυτταρικές μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Απορροφάται εύκολα μέσω της διατροφής, και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αφού απενεργοποιεί τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αναγεννά ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E και η γλουταθειόνη και συμμετέχει στη χηλίωση οξειδοαναγωγικών μετάλλων όπως ο σίδηρος (Fe) και ο χαλκός (Cu).

Το *σελήνιο (Se)* είναι γνωστό για την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του και συμμετέχει στον μηχανισμό δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), προστατεύοντας τα κυτταρικά συστατικά από την οξειδωτική βλάβη.

Το *β-καροτένιο*, ανήκει στην ομάδα των καροτενοειδών και είναι ένα χημικά δραστικό μόριο απέναντι σε ελεύθερες ρίζες, που σε επαρκή συγκέντρωση είναι ικανό να προστατέψει τα λιπίδια από την οξειδωτική βλάβη (Valko et al., 2006).

Το *συνένζυμο Q-10*, δηλαδή η ουβικινόνη, είναι μία υδρόφιλη χημική ένωση που συμμετέχει ενεργά στη μεταφορά ηλεκτρονίων στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες, στο κυτταρόπλασμα και στις λιποπρωτεΐνες όπου συμβάλλει στην παρεμπόδιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Zahra et al., 2021).

Το ουρικό οξύ εντοπίζεται σε κύτταρα, ιστούς και όργανα με το ήπαρ να αποτελεί το σημαντικότερο όργανο που παράγει ουρικό οξύ, αλλά δε διαθέτει και τη μεγαλύτερη ποσότητα (D. Liu et al., 2019). Η κυριότερη πηγή ουρικού οξέος είναι οι πουρίνες, αφού αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους. Αποτελεί ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά στο πλάσμα του αίματος, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Μία σημαντική τους δράση είναι η προστασία των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων από τη λιπιδική υπεροξειδωση (Sautin & Johnson, 2008).

1.7. Ελιά

Το ελαιόδεντρο ανήκει στην οικογένεια των *Oleaceae*, που περιλαμβάνει 30 γένη και 180 είδη. Το είδος *Olea europaea* προέρχεται από την ελληνική λέξη *Olea* (ελιά) και καλλιεργούνται αδιάλειπτα στη λεκάνη της Μεσογείου από το 4800 π.Χ. Πρόκειται λοιπόν για ένα από τα αρχαιότερα είδη δέντρων. Η θεώρηση του ελαιόδεντρου αυτού ως μεμονωμένο είδος αμφισβητήθηκε από πολλούς επιστήμονες, με αποτέλεσμα να το κατατάσσουν στην κατηγορία των διπλοειδών, αφού έχει γονότυπο που αποτελείται από 46 χρωμοσώματα και προέκυψε από υβριδισμό και μετάλλαξη τροπικών και υποτροπικών ειδών, δηλαδή των *Olea chrysophilla* και *Olea excelsa* (Evangelou et al., 2018).

Είναι γεγονός πως οι “επιτραπέζιες ελιές” και το ελαιόλαδο, προϊόντα της καλλιέργειας των ελαιόδέντρων, αποτελούν αδιαμφισβήτητα ακρογωνιαίο λίθο και απαραίτητα συστατικά μίας ισορροπημένης και υγιεινής διατροφής και συγκεκριμένα της Μεσογειακής (Mougiou et al., 2020). Η σπουδαιότητα της Μεσογειακής διατροφής αποδεικνύεται από επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν ότι η εμφάνιση περιστατικών καρδιακών προσβολών, νευροδιαβιβαστικών ασθενειών και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, όπως του μαστού και του παχέος εντέρου, είναι λιγότερο συχνή στους πληθυσμούς της περιοχής της Μεσογείου, εφόσον ακολουθούν τη δίαιτα αυτή. Συγκεκριμένα, η διατροφή αυτή περιλαμβάνει περιορισμένη κατανάλωση κρέατος και τροφίμων με μεγάλη περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και στροφή των καταναλωτών σε τροφές πλούσιες σε μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα και φυτικές ίνες. Τέλος συνίσταται η τακτική χρήση ελαιόλαδου (Visioli et al., 2002). Μάλιστα, το 2010, οι επιτραπέζιες ελιές προτέθηκαν στην Πυραμίδα Υγιεινής Διατροφής της Μεσογειακής διατροφής, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε βιοδραστικές χημικές ενώσεις, εδώδιμες ίνες, λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά (Perpetuini et al., 2020).

Γενικότερα, οι επιτραπέζιες ελιές ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες εμπορικών παρασκευασμάτων. Αυτές είναι οι πράσινες ή ισπανικού τύπου ελιές (50% της συνολικής παραγωγής), οι ώριμες μαύρες ή καλιφορνέζικου τύπου ελιές (25% της συνολικής παραγωγής) και οι φυσικά μαύρες ή ελληνικού τύπου ελιές (25% της συνολικής παραγωγής). Οι ελιές

αυτές συγκομίζονται όταν το χρώμα τους γίνεται πράσινο-σταχύ, κίτρινο-μωβ και μαύρο, αντίστοιχα (Romero et al., 2004).

1.7.1. Ιστορία της ελιάς

Η καλλιέργεια των ελαιόδεντρων στην περιοχή της Μεσογείου χρονολογείται ήδη από τα αρχαία χρόνια. Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, ο θεός Δίας ήταν αρχικά ο προστάτης του ιερού δέντρου της ελιάς. Ωστόσο, η θεά Αθηνά το προσέφερε ως δώρο στην πόλη της Αθήνας, αφού φύτεψε το πρώτο ελαιόδεντρο στην Ακρόπολη. Επίσης η Αθηνά δίδαξε στους κατοίκους τη διαδικασία καλλιέργειας της ελιάς και τη φροντίδα του καρπού, με αποτέλεσμα να θεωρηθεί εκείνη τελικά η προστάτιδα της καλλιέργειας αυτής. Ακολούθως, το δέντρο αυτό, διαδόθηκε σε ολόκληρη την αρχαία Ελλάδα, καθώς και απ' άκρη σ' άκρη στη λεκάνη της Μεσογείου. Αξίζει να αναφερθεί ότι στη Μασσαλία και στο Λανγκεντόκ, περιοχές της Γαλλίας, υπάρχει απόδειξη καλλιέργειας της ελιάς από τον 4ο αιώνα π.Χ. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια των Ρωμαϊκών χρόνων, η Τυνησία ήταν γνωστή για τους ελαιώνες της, με την περιοχή της Τζέρμπα να θεωρείται μία οάση από ελαιόδεντρα ακόμα και τον 16ο αιώνα (Loumou & Giourga, 2003).

Οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν ένα από τα προϊόντα του ελαιόδεντρου, το ελαιόλαδο, ως αντικείμενο αγοραπωλησίας, ήδη από τις απαρχές του Μινωικού πολιτισμού (3000 π.Χ.). Την εποχή εκείνη αποτελούσε εξαγωγίμο προϊόν των κατοίκων της Κρήτης προς την ελληνική ηπειρωτική χώρα και μερικές περιοχές της βόρειας Αφρικής και της Μικράς Ασίας, καθιστώντας το αναπόσπαστο στοιχείο της οικονομίας της περιοχής. Υπάρχουν πολλά κείμενα που χαρακτηρίζουν το ελαιόδεντρο ως στοιχείο πολιτιστικής και γαστρονομικής κληρονομιάς και σύμβολο γνώσης, σοφίας, αφθονίας, υγείας, δύναμης, ομορφιάς και ειρήνης μεταξύ των εθνών. Επιπρόσθετα, μία ακόμη πρακτική της αρχαιότητας που αποδεικνύει την σπουδαιότητα του δέντρου της ελιάς, ήταν η απονομή στους νικητές των αρχαίων Ολυμπιακών Αγώνων (775 π.Χ.-393 μ.Χ.) κλαδιού ή στεφανιού ελιάς. Τέλος, τον 6ο αιώνα π.Χ., ο Αθηναίος νομοθέτης Σόλων, επέβαλε νόμους για την προστασία του ελαιόδεντρου, ενώ πολλές ήταν και οι αναφορές αρχαίων

φιλοσόφων, ιστορικών και ιατρών, όπως του Ιπποκράτη, στις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου (Evangelou et al., 2018).

1.7.2. Οικονομικά στοιχεία

Σύμφωνα με την αναφορά του Διεθνούς Συμβουλίου της ελιάς (International Olive Council) η παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών έχει αυξηθεί συστηματικά, καθώς το 1990/1991 ανερχόταν στους 950.000 τόνους , ενώ το 2016/2017 έφτασε τους 2.889.000 τόνους (Rocha et al., 2020). Επίσης σύμφωνα με τελευταία στοιχεία, την περίοδο 2017/2018 η παραγωγή τους ξεπέρασε τους 2,9 εκατομμύρια τόνους (Perpetuini et al., 2020).

Αν και το ελαιόδεντρο αποτελεί μία καλλιέργεια που είναι καλά προσαρμοσμένη στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στη λεκάνη της Μεσογείου, η σημαντική αύξηση των διεθνών απαιτήσεων σε ελαιόλαδο και επιτραπέζιες ελιές έχει καταστήσει αναγκαία την επέκταση της καλλιέργειας της ελιάς και σε χώρες του νότιου ημισφαιρίου (Torres et al., 2017).

Η μεγαλύτερη ποσότητα παράγεται σε Μεσογειακές χώρες, δηλαδή στην Ισπανία, στην Ελλάδα, στην Ιταλία και στην Πορτογαλία. Βέβαια, δε θα πρέπει να παραλειφθεί ότι και η Αίγυπτος, η Τουρκία, η Συρία και το Μαρόκο παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διεθνή παραγωγή επιτραπέζιων ελιών (Rocha et al., 2020). Βέβαια, η παραγωγή τους έχει αυξηθεί σημαντικά και στην Νότια Αμερική, συγκεκριμένα στην Αργεντινή, στη Χιλή και στο Περού, όπως και στην Αυστραλία και στη Μέση Ανατολή (Perpetuini et al., 2020).

Όσον αφορά την παγκόσμια κατανάλωση των επιτραπέζιων ελιών, έχει αυξηθεί και αυτή συγκριτικά με το 1990/1991, αλλά όχι τόσο θεαματικά. Ανέρχεται σε 2.724.000 τόνους, με την Αίγυπτο, την Τουρκία και την Αλγερία να αποτελούν τους κύριους καταναλωτές, ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση η Ισπανία έχει τον πρωταγωνιστικό ρόλο στην κατανάλωση (Rocha et al., 2020).

1.7.3. Μορφολογία ελαιόδεντρου και ελαιόκαρπου

Το ελαιόδεντρο είναι ένα μεσαίου μεγέθους αιθαλές δέντρο που αναπτύσσεται εγγενώς σε ξηρές υπαίθριες περιοχές με Μεσογειακό κλίμα. Τα χαρακτηριστικά του όπως το ύψος του, η πυκνότητα του και το μέγεθος και σχήμα του καρπού σχετίζονται με τον γονότυπο του (Rugini et al., 2016). Χαρακτηρίζεται από ευρύ και σταθερό γονότυπο, διασταυρούμενη αναπαραγωγή, μακροζωία και συντήρηση της παραγωγικότητας για πολλά χρόνια (Evangelou et al., 2018).

Είναι εξαιρετικά εύπλαστο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του, με αποτέλεσμα οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι γεωργικές πρακτικές διαχείρισης, όπως το κλάδεμα και η άρδευση του επηρεάζουν τόσο το ίδιο το δέντρο όσο και την μορφή των φρούτων του (Rugini et al., 2016). Είναι ένα δέντρο σχετικά αργά αναπτυσσόμενο αλλά με μεγάλη διάρκεια ζωής. Η παραγωγή του ξεκινά 5-6 χρόνια μετά το φύτεμα και η μέγιστη παραγωγικότητα επιτυγχάνεται πολλά χρόνια αργότερα, μόλις τα δέντρα μεγαλώσουν αρκετά. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως εάν η διαχείριση και η φροντίδα της ελιάς γίνει με σωστό τρόπο, τότε αυτή μπορεί να καρποφορεί για εκατοντάδες χρόνια (Langgut et al., 2019).



Εικόνα 17 : Το ελαιόδεντρο

Ο ελαιόκαρπος που παράγεται από το ελαιόδεντρο είναι ένας ωοειδής καρπός με σκληρό κουκούτσι “δρύπη”, μονόσπερμος, με σαρκώδες εξωτερικό

στρώμα και αποτελείται από τρία διακριτά μέρη. Συγκεκριμένα, αυτά είναι το εξωκάρπιο (προστατευτική φλούδα), που αποτελεί μόνο 1-3% του συνολικού βάρους του καρπού, το μεσοκάρπιο (σάρκα) (70-90% του συνολικού βάρους του καρπού) και το ενδοκάρπιο (πυρήνας), που περιέχει τον σπόρο (13-30% του συνολικού βάρους του καρπού). Τα τρία αυτά μέρη επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ένας αντιπροσωπευτικός ελαιόκαρπος έχει μήκος 2-3cm, βάρος 2-12g, και αναλογία σάρκας προς κουκούτσι 3,0-6,5.

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη των καρπών διαρκεί 4-5 μήνες, κατά τους οποίους το μέγεθος, το χρώμα, η υφή, η γεύση και η σύσταση διαφοροποιούνται μέσω βιοχημικών και φυσιολογικών μονοπατιών, όπως κυτταρική διαίρεση, κυτταρική επέκταση και συσσώρευση μεταβολιτών (Evangelou et al., 2018). Έτσι το χρώμα του εξωκάρπιου διαφοροποιείται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς. Σε πρώιμο στάδιο, το χρώμα τους είναι έντονο πράσινο, ενώ μετέπειτα, αλλάζει εξαιτίας των διαφοροποιημένων συγκεντρώσεων χρωστικών, όπως οι χλωροφύλλες, καροτενοειδή και ανθοκυανίνες. Επομένως, το χρώμα τους μετατρέπεται σε ανοιχτό πράσινο, χρυσόξανθο, ρόδινο και μαύρο.

Η σύσταση του μεσοκάρπιου χαρακτηρίζεται, σε γενικά πλαίσια, από 70-75% νερό και 14-15% λιπαρά στις πράσινες και 30% λιπαρά στις μαύρες ώριμες επιτραπέζιες ελιές. Αξίζει να αναφερθεί ότι και ο πυρήνας περιέχει μία αξιόλογη ποσότητα λιπαρών (22-27%) (Rocha et al., 2020).

1.7.4. Συνθήκες καλλιέργειας

Το γεγονός ότι η ελιά αποτελεί μία από τις χαρακτηριστικότερες καλλιέργειες της Μεσογείου εξαιτίας του κλίματος, φαίνεται από την άποψη των γεωγράφων, σύμφωνα με τους οποίους, το πρώτο ελαιόδεντρο που συναντά κάποιος κινούμενος από τον βορρά προς τον νότο, είναι η απόδειξη εισόδου στην περιοχή της Μεσογείου (Loumou & Giourga, 2003).

Ένας καθοριστικός κλιματικός παράγοντας που περιορίζει πολύ τη διάδοση της καλλιέργειας της ελιάς είναι η θερμοκρασία. Η ανάπτυξη των ελαιόδεντρων, η απόδοση τους και η ποιότητα των τελικών τους προϊόντων

ευνοούνται σε περιοχές με μέτρια κρύους χειμώνες και ζεστή και ξηρή ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των καρπών (15-20°C). Τα ελαιόδεντρα δεν παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στον παγετό, με τις διάφορες καλλιεργητικές ποικιλίες να αποκρίνονται διαφορετικά στην επίδραση του κρύου καιρού. Η ελιά δεν μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες μικρότερες των -7°C και οι ιδανικές για εκείνη θερμοκρασίες κατά την χειμερινή περίοδο είναι 5-15°C, προκειμένου να αποφευχθεί ο "λήθαργος" και να μπορέσει να ανθοφορήσει την άνοιξη (Mougiou et al., 2020). Επίσης η ανομβρία συμβάλει σημαντικά στον περιορισμό της ανάπτυξης τους. Ωστόσο το ελαιόδεντρο αποτελεί μία από τις πιο ανθεκτικές, στη ξηρασία, καλλιέργειες και αναπτύσσει αρκετούς μηχανισμούς προκειμένου να αντιμετωπίσει την έλλειψη νερού (Stefanoudaki et al., 2009).

1.7.5. "Terroir"

Η σχέση μεταξύ ενός τροφίμου και της γεωγραφικής του προέλευσης εκφράζεται με τον όρο "terroir". Ο όρος αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία, όπως αποδεικνύει και η ρύθμιση της Ευρωπαϊκής Ένωσης που καθιέρωσε το σήμα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) και αποδίδει τα μοναδικά χαρακτηριστικά ενός προϊόντος στη γεωγραφική τοποθεσία όπου παράγεται. Από γεωλογικής πλευράς, το "terroir" είναι ένα σύνολο δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ διάφορων φυσικών παραγόντων, όπως το χώμα και το νερό (Damak et al., 2021). Προέρχεται από τη γαλλική λέξη "terre" που σημαίνει "έδαφος" και περιγράφει πώς το μέρος προέλευσης ενός τροφίμου προσδίδει σε αυτό μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αναφέρεται και σε πολιτισμικά γνωρίσματα, αποτελώντας έτσι στοιχείο ταυτότητας για έναν τόπο (Rellini et al., 2022).

Η έννοια "terroir" χρησιμοποιήθηκε αρχικά για το κρασί, αλλά πλέον αφορά και άλλες καλλιέργειες όπως είναι τα ελαιόδεντρα. Περιλαμβάνει και διαμορφώνεται από ποικίλους παράγοντες, όπως είναι το χώμα, οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία κλπ) και οι πρακτικές που εφαρμόζονται κατά την καλλιέργεια (Russo et al., 2020). Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, αφού το 2010 υπήρχαν ήδη περισσότερα από

100 είδη εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων παγκοσμίως, για τα οποία επισημάνθηκε η προέλευση τους, με τα περισσότερα να προέρχονται από την Ιταλία, την Ελλάδα και την Ισπανία. Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η διαφορετική καλλιεργητική ποικιλία, το χώμα, το κλίμα, η καλλιεργητική διαχείριση, ο τρόπος συλλογής των ελαιόκαρπων, η μέθοδος εκχύλισης και οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά και τη χημική του σύσταση (Clark & Kerr, 2017).

1.8. Σύσταση του ελαιόκαρπου

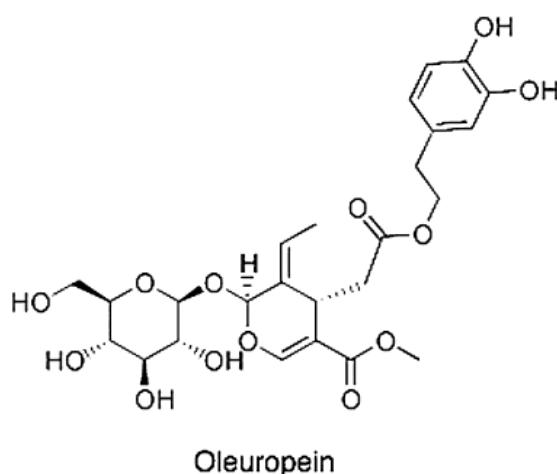
Η χημική σύσταση των ελαιόκαρπων είναι πολυποίκιλη και διαφοροποιείται ανάλογα με το καλλιεργητικό είδος, τις κλιματικές συνθήκες, τη γεωγραφική θέση και τον βαθμό ωρίμανσης. Τα κυριότερα συστατικά τους είναι νερό, λιπαρά οξέα, σάκχαρα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τοκοφερόλες, ανθοκυανίνες κ.α.) και άλλα συστατικά όπως ταννίνες, χρωστικές, οργανικά οξέα και ανόργανες ουσίες (Evangelou et al., 2018).

Είναι γνωστό ότι πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως αρτηριακή πίεση, καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνος, διαβήτης, φλεγμονώδεις παθήσεις, γήρανση κ.α., μπορούν να αποφευχθούν με τη βοήθεια φυσικών φαινολικών βιομορίων που περιέχονται σε φρούτα και λαχανικά της Μεσογειακής διατροφής, με την ελιά να συγκαταλέγεται σε αυτά (Bianco & Uccella, 2000).

Ο ελαιόκαρπος είναι πλούσιος σε φαινολικές ενώσεις, με το 2% μόνο του συνολικού περιεχομένου να περνά την ελαιώδη φάση και το 53% αυτών να βρίσκονται στην υδατική. Οι πολυφαινόλες ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες και είναι πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά μόρια. Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 2000 άρχισε να γίνεται εκχύλιση των πολυφαινολών από λύματα ελαιουργείου, που εισήχθησαν στην αγορά λόγω των σημαντικών ωφελειών τους στην υγεία. Συγκεκριμένα, μία πολύ σπουδαία δράση των πολυφαινολών είναι η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες που δημιουργείται σε έναν οργανισμό. Μάλιστα, το 2011, η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) ενέκρινε τον ισχυρισμό υγείας που

αφορούσε τη συμβολή των πολυφαινολών του ελαιόλαδου στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες (Ciriminna et al., 2016).

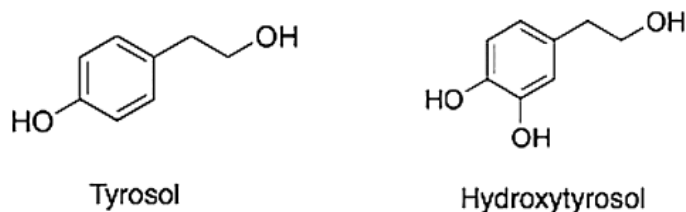
Η σημαντικότερη πολυφαινόλη που περιέχεται στις πράσινες ελιές είναι η ελευρωπαΐνη (oleuropein), ένας γλυκοζιτικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης (3,4-dihydroxyphenyl ethanol) και του ελενολικού οξέος (elenolic acid), στην οποία οφείλεται η χαρακτηριστική πικρή γεύση της ελιάς. Η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης μειώνεται με την ωρίμανση του καρπού και την άρδευση του ελαιόδεντρου, με αποτέλεσμα οι μαύρες ελιές να περιέχουν την ουσία αυτή σε πολύ μικρότερη ποσότητα έως μηδενική (Romero et al., 2004). Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και παρεμποδίζει τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Αυτή οφείλεται στην ύπαρξη της υδροξυτυροσόλης στη χημική δομή της. Τέλος βοηθά στη πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, παρεμποδίζοντας την οξείδωση της LDL και αποτρέπει την αντίδραση μορίων, που υπάρχουν στο αγγειακό τοίχωμα, με το οξυγόνο (Ozturk et al., 2014).



Εικόνα 18 : Το μόριο της ελευρωπαΐνης (Ciriminna et al., 2016)

Επίσης, δύο ακόμα από τις πιο άφθονες πολυφαινόλες που περιέχονται στον ελαιόκαρπο είναι η τυροσόλη (tyrosol) και η υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol), με τη δεύτερη να προκύπτει από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης, κατά την ωρίμανση της ελιάς. Η υδροξυτυροσόλη, όπως και η ελευρωπαΐνη, εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική

δράση, εξαιτίας της ικανότητας της να σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου μεταξύ των ελεύθερων υδρογόνων της υδροξυλομάδας τους και των ριζών φαινοξυλίου τους. Η δραστηριότητα της είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της τυροσόλης, αφού έχει δείχτεί ότι η διαμόρφωση όρθο- για τις ομάδες υδροξυλίου, προσδίδει στο μόριο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την μονή υποκατάσταση (Visioli et al., 2002). Έχει αποδειχτεί ότι η υδροξυτυροσόλη δρα εναντίον των ROS και παρεμποδίζει την οξείδωση της ανθρώπινης LDL, αποτρέποντας την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης και καρδιακών νόσων. Επιπρόσθετα συμβάλει στην αντιμετώπιση χρόνιων φλεγμονών, όπως η αρθρίτιδα και στην βελτιωμένη λειτουργία των μιτοχονδρίων στους ιστούς (Ciriminna et al., 2016).



Εικόνα 19 : Τα μόρια της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης (Ciriminna et al., 2016)

Μερικές ακόμα φυσικές φαινόλες που έχουν βρεθεί στην ελιά είναι η βερμπασκοσίδη, η λιγουςτροσίδη, η σαλιδροσίδη, η ρουτίνη, η λουτεολίνη-7-γλυκοσίδη και οι ανθοκυανίνες, κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη και η κυανιδίνη-3-ρουτινοσίδη. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί, ότι ενώ η πλειοψηφία των επιτραπέζιων ελιών περιέχει το σύνολο των ουσιών αυτών, η κάθε καλλιεργητική ποικιλία έχει το δικό της πολυφαινολικό προφίλ (Romero et al., 2004).

1.9. Ποικιλία «Κορωνέικη»

Η Κορωνέικη (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) ή (*Olea europaea* var. *Mastoids*) αποτελεί μία από τις κύριες ποικιλίες ελιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, καταλαμβάνοντας περίπου το 60% της συνολικής παραγωγής στη χώρα. Εμφανίστηκε και καλλιεργήθηκε στη Μεσσηνία της Πελοποννήσου, από όπου και πήρε το όνομα της. Άλλες ονομασίες με τις οποίες είναι γνωστή είναι Βάτσικη, Κρητικιά, Κορωνιά, Κορώνι, Λαδολιά, Λιανολιά και Ψιλολιά.

Οι ελαιόκαρποι της ποικιλίας αυτής είναι μικροί σε μέγεθος (μικρόκαρπη ποικιλία), με βάρος 0,5-1,4 g, οι αποδόσεις των ελαιόδεντρων είναι υψηλές και οι καρποί χαρακτηρίζονται από μία παρατεταμένη περίοδο ωρίμανσης. Η ωρίμανση τους γίνεται από τις αρχές Νοεμβρίου μέχρι και το τέλος Δεκεμβρίου. Το ελαιόλαδο που παράγεται από αυτούς είναι εξαιρετικής ποιότητας, πλούσιο σε πολυφαινόλες, με φρουτώδη γεύση και άρωμα από φύλλα και γρασίδι, με νότες πράσινου μήλου και μία αίσθηση στυφότητας (Kafkaletou et al., 2021). Επιπλέον, η διάρκεια ζωής του είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτό που παράγεται από άλλες ποικιλίες (Theodosi et al., 2021).

Όσον αφορά τις συνθήκες καλλιέργειας της, είναι ανθεκτική σε δυσμενείς καιρικές συνθήκες, σε έντομα και στη ξηρασία. Προσαρμόζεται πολύ καλά τόσο σε υγρές όσο και σε ξηρές περιοχές και ευδοκίμει σε ευρύ φάσμα υψομέτρων, από την επιφάνεια της θάλασσας μέχρι και υψόμετρα άνω των 500m (Theodosi et al., 2021).



Εικόνα 20 : Οι ελαιόκαρποι της Κορωνέικης ποικιλίας

1.10. Ποικιλία «Αθηνολιά»

Η Αθηνολιά (*Olea europaea* var. *Mamillaris* sub. *Minima*) είναι γνωστή και με το όνομα Τσουνάτη. Ωστόσο η κοινή της ονομασία είναι Μαστοειδής. Καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Πελοποννήσου (κεντρικά και νότια) και στη δυτική Κρήτη. Ο καρπός της θεωρείται μικρόκαρπος έως μεσόκαρπος, με βάρος 1,4-2,25 g και έχει χρυσαφένιο-πράσινο χρώμα. Τα γευστικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου της ποικιλίας αυτής είναι παρόμοια με της Κορωνέικης, αλλά λιγότερο έντονα (Monteleone, 2013).

Η ωρίμανση των ελαιόκαρπων είναι πρόωμη και η καλλιέργεια γίνεται και σε ψηλό υψόμετρο, έως 1000m. Θεωρείται λιγότερο ανθεκτική στη ξηρασία, σε σχέση με την ποικιλία «Κορωνέικη» (Chartzoulakis et al., 1999).



Εικόνα 21 : Οι ελαιόκαρποι της ποικιλίας «Αθηνολιά»

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοδραστικότητας της υδατικής φάσης ελαιόκαρπων, που ανήκουν στις ποικιλίες «Κορωνέικη» και «Αθηνολιά», σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα “ΜΚΝ-45”. Για τον λόγο αυτό ερευνήθηκε η επίδραση αυξανόμενων μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων δειγμάτων, μέσω προσδιορισμού των ενδοκυτταρικών επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον, μελετήθηκε ο δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης, μέσω της μεθόδου TBARS. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση των διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών και της γεωργικής διαχείρισης στην βιοδραστικότητα των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, οι δύο διαφορετικές ποικιλίες που μελετήθηκαν, διέφεραν τόσο ως προς το υψόμετρο, όσο και ως προς την πραγματοποίηση ή όχι αρδευτικής διαδικασίας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Όργανα και Υλικά

Συσκευές-Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας είναι ο θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (hood), ο κλίβανος επώασης Shel Lab (37°C, 5% CO₂ και 99% υγρασία), ο κλίβανος επώασης Binder (40°C), το μικροσκόπιο KERN Optics, υδατόλουτρο, η φυγόκεντρος Centrifuge 5804 R, η φυγόκεντρος Thermo Scientific, η φυγόκεντρος Hettich Zentrifugen MIKRO 185, το φασματοφωτόμετρο VWR UV-1600PC, το φασματοφωτόμετρο Spectrophotometer U-1500 και η συσκευή φασματοφωτομετρικής αποτίμησης byonoy (Absorbance 96).

Υλικά-Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας είναι φλάσκες T₂₅ και T₇₅ (εμβαδού 25cm² και 75cm² αντίστοιχα), 96-Well Plate Template, 6-Well Plate Template, αυτόματες πιπέτες των 2-20μL, 20-200μL και 100-1000μL, falcons των 15mL και των 50mL, erppendorfs των 1,5mL και 2mL, ποτήρια ζέσεως και ογκομετρικοί κύλινδροι. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν το θρεπτικό υλικό 1g/L γλυκόζη RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), ο ορός εμβρύου βοοειδών FBS (fetal bovine serum), διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, το άλας PBS (Phosphate Buffered Saline) με pH 7,4 και η θρυψίνη 5X (1,25%) από την εταιρεία Gibco (UK), η πλάκα μέτρησης κυττάρων Neubauer, το kit για τη μέθοδο XTT της εταιρείας Roche Diagnostics (Mannheim, Germany), οι χρωστικές DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), thiol Green Dye και η αλβουμίνη από ορό αίματος βοοειδούς της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Τέλος παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο Bradford, το buffer Tris-HCl (200mM, pH=7,4) και τα διαλύματα Na₂SO₄(2M)-TBA(55mM) και τριχλωροξικό οξύ (TCA) σε συγκεντρώσεις 35% και 70%.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Σε πρώτο στάδιο έγινε επιλογή ποικιλιών βρώσιμης ελιάς από εδάφη που διαφέρουν εδαφολογικά και υψομετρικά ή εφαρμόζονται σε αυτά διαφορετικές τεχνικές καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα δείγματα επεξεργάστηκαν με την εφαρμογή των μεθόδων της Εκχύλισης με Υπερκρίσιμα Υγρά (Supercritical Fluid Extraction – SFE) και της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction – ASE). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων, για την απομάκρυνση των αποβλήτων, διαχωρισμός του περικάρπιου (σάρκα) του ελαιόκαρπου από το ενδοκάρπιο (πυρήνας), ομογενοποίηση της σάρκας και φυγοκέντρωση με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών φάσεων, της υδατικής, της ελαιώδους και της στερεής. Απομονώνονται οι δύο πρώτες, εκ των οποίων η υδατική φυγοκεντρείται ξανά με στόχο την συλλογή των φυτικών υγρών και τελικά την μελέτη της επίδρασης τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων.

Τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι η ποικιλία «Κορωνέικη» ξηρική σε υψόμετρο 580m, η ποικιλία «Κορωνέικη» ποτιστική σε υψόμετρο 152m, η ποικιλία «Αθηνολιά» ξηρική σε υψόμετρο 630m και η ποικιλία «Αθηνολιά» ποτιστική σε υψόμετρο 270m.

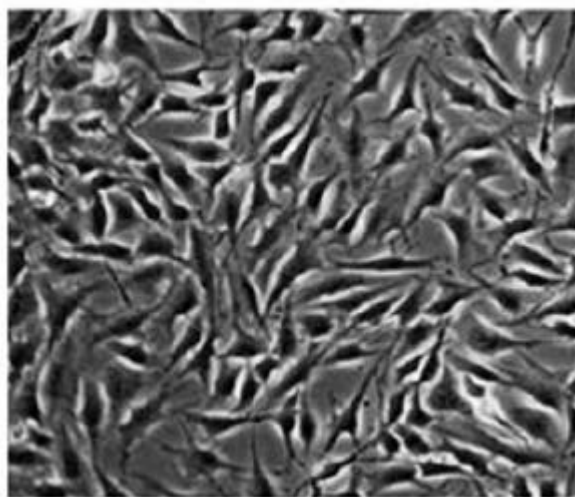
3.2.2. Κυτταροκαλλιέργεια

3.2.2.1. Κυτταρική σειρά “MKN-45”

Είναι γνωστό ότι ο γαστρικός καρκίνος (Gastric Cancer) είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους καρκίνους παγκοσμίως, που εμφανίζεται σε περισσότερους από 1,2 εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο. Μάλιστα αποτελεί την τρίτη πιο συχνή μορφή καρκίνου που προκαλεί θνησιμότητα (W. Sun et al., 2023)

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα MKN-45, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των υδατικών φάσεων ελιάς στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων αυτών.

Η σειρά MKN-45 είναι μία αθανατοποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά, η οποία αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της φυσιολογίας του γαστρικού καρκίνου και την αντιμετώπιση του. Είναι διαφοροποιημένα κύτταρα αδενοκαρκινώματος, που απομονώθηκαν για πρώτη φορά από μία γυναίκα ασθενή, Ασιατικής καταγωγής, ηλικίας 62 ετών. Βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι, ότι η παραγωγή του καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (CEA) είναι υψηλότερη από τα φυσιολογικά επίπεδα. Όσον αφορά τη μορφολογία τους, είναι σφαιρική, και η καλλιέργεια τους παρουσιάζει τάση προσκόλλησης (Miwa et al., 2019).



Εικόνα 22 : Κύτταρα MKN-45 σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x200) (Κ. Liu et al., 2016)

3.2.2.2. Συνθήκες καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς “MKN-45”

Τα καρκινικά κύτταρα MKN-45 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό 1g/L γλυκόζη RPMI, το οποίο εμπεριείχε ορό εμβρύου βοοειδών (FBS, 10% v/v) και διάλυμα 1% v/v στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης, με συνθήκες πλήρως ασηπτικές.

Η ανακαλλιέργεια (split), πραγματοποιούνταν κάθε φορά που τα

κύτταρα καταλάμβαναν το 70% της επιφάνειας της φλάσκας και είχε ως αποτέλεσμα τον διαμοιρασμό των κυττάρων σε περισσότερες φλάσκες. Περιλαμβάνει την προσθήκη θρυψίνης, ενός ενζύμου που διασπά τις πρωτεΐνες που συνδέουν τα κύτταρα με την επιφάνεια της φλάσκας και τελικά την αραίωση της με την προσθήκη θρεπτικού μέσου (1:5), ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση του ενζύμου. Πολύ σημαντική λεπτομέρεια σε αυτό το βήμα είναι να μην επωαστούν τα κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα με την θρυψίνη, καθώς είναι κυτταροτοξική και αλλοιώνει τη φυσιολογία των κυττάρων. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε falcon, φυγοκέντρηση (160g, 5min) και προσθήκη θρεπτικού μέσου για τη δημιουργία νέου κυτταρικού αιωρήματος, το οποίο διαμοιράζεται σε νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό υλικό.

3.2.3. Μέθοδος ΧΤΤ - Προσδιορισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης δειγμάτων ελιάς σε καρκινικά κύτταρα “ΜΚΝ-45”

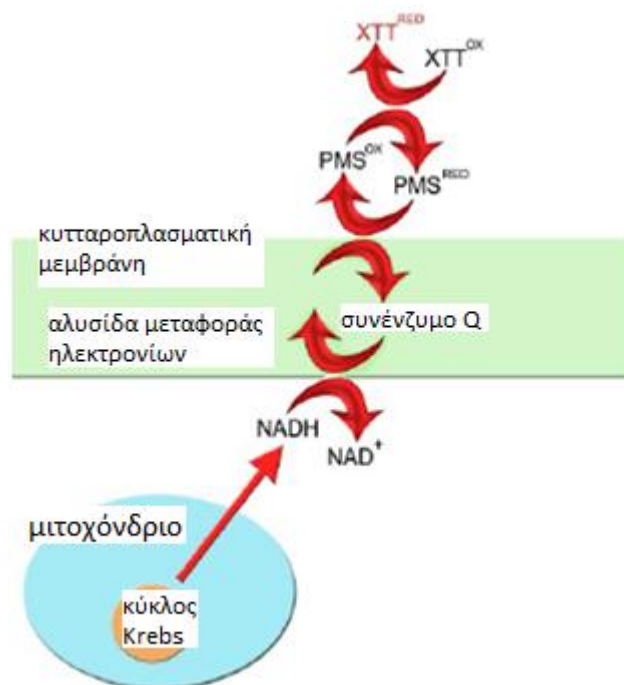
Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος ΧΤΤ είναι μία ακριβής και ευαίσθητη χρωματομετρική τεχνική που ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί την κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα. Χρησιμοποιείται επομένως για τον προσδιορισμό της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης ενός εκχυλίσματος, λαμβάνοντας υπόψη την χαμηλή βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από προσθήκη του.

Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 από τους Scudiero et al, ως μία αποτελεσματική μέθοδος για την αξιολόγηση της επίδρασης των φαρμάκων στην κυτταρική ανάπτυξη (Scudiero et al, 1988).

Η μέθοδος βασίζεται στη μεταβολική αναγωγή από ζωντανά κύτταρα, του τετραμμωνιακού άλατος (ΧΤΤ), το οποίο είναι άχρωμο ή ελαφρώς κίτρινο, σε ένα υδατοδιαλυτό παράγωγο της φορμαζάνης με έντονα πορτοκαλί χρώμα, που απορροφά στα 450 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου βελτιστοποιείται με τη χρήση ενός φορέα ηλεκτρονίων, του PMS (N-methyl dibenzopyrazine methylsulfate), το οποίο λειτουργεί ως αντιδραστήριο

ενεργοποίησης. Μειωμένη απορρόφηση υποδηλώνει μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμετωνιακού άλατος από τα κύτταρα, που συνεπάγεται τη θανάτωση τους.



Εικόνα 23 : Αναγωγή του XTT από κυτταρικά ένζυμα (XTT Cell Proliferation Assay Kit, Instruction Manual, ATCC)

Πειραματική Διαδικασία

Για τη μέθοδο XTT χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες T₇₅ για την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς MKN-45 και επαρκής αριθμός από πλάκες 96-Well Plate Template. Μετά από θρυψινοποίηση και δημιουργία νέου κυτταρικού αιωρήματος, ακολουθεί η καταμέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Γίνεται αραίωση 1:2 του κυτταρικού αιωρήματος με θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται 10μL ανάμεσα από την καλυπτρίδα και την πλάκα Neubauer. Αφού γίνει η μέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα, υπολογίζεται η ποσότητα κυτταρικού αιωρήματος και θρεπτικού υλικού που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να περιέχονται 10.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι (well). Τέλος, σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας, τοποθετείται συνολική ποσότητα ίση με 100μL. Οι πλάκες επωάζονται σε

κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

Μετά την επώαση, ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων υδατικής φάσης ελιάς, αραιωμένα σε θρεπτικό υλικό. Αρχικά παρασκευάζεται το stock διάλυμα με συγκέντρωση 200μL/mL και πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1:2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό χρησιμοποιώντας μία πολυκάναλη πιπέτα και προστίθεται ποσότητα ίση με 100μL σε κάθε πηγαδάκι, με τρεις επαναλήψεις για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν έξι control μεθόδου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μέθοδος λειτουργεί σωστά, ένα αρνητικό control, προκειμένου να βρεθεί η απορρόφηση που έχει το ίδιο το θρεπτικό υλικό και αρνητικά control για κάθε συγκέντρωση, προκειμένου να βρεθεί η απορρόφηση του ίδιου του δείγματος. Τέλος οι πλάκες επωάζονται σε κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

Μετά την επώαση, ακολουθεί η προσθήκη 50μL από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε πηγαδάκι. Παρασκευάστηκε ένα MasterMix, του XTT Reagent με το XTT Activator και ακολούθησε επώαση σε κλίβανο, στους 37°C για 4 ώρες.

Η φασματοφωτομετρική αποτίμηση των πλακών γίνεται σε δύο μήκη κύματος, στα 450nm και στα 630nm. Στην τελική τιμή που δίνεται συμπεριλαμβάνεται η αφαίρεση της απορρόφησης στα 630nm από την απορρόφηση στα 450nm, καθώς αφορά την απορρόφηση του πλαστικού, η οποία δε θα πρέπει να ληφθεί υπόψη.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης με βάση τον τύπο:

$$\text{αναστολή (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{control}}} \times 100,$$

Όπου A_{control} και $A_{\text{δείγματος}}$ είναι η απορρόφηση του αρνητικού control και του εκάστοτε δείγματος, αντίστοιχα.

3.2.4. Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry) - Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε καρκινικά κύτταρα “MKN-45”

Αρχή Μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανάλυση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής και ηλεκτρονικής ανίχνευσης, με τα κύτταρα να βρίσκονται υπό την μορφή εναιωρήματος μέσα σε ένα διάλυμα. Με τη μέθοδο αυτή μετρείται το μέγεθος ενός κυττάρου, η εσωτερική του πολυπλοκότητα και η ένταση φθορισμού του. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται ένα κυτταρόμετρο είναι το *ρευστό*, το *οπτικό* και το *ηλεκτρονικό σύστημα*. Στο *ρευστό σύστημα*, τα κύτταρα, με τη μορφή εναιωρήματος σε διάλυμα, κινούνται το ένα πίσω από το άλλο και συναντούν τη δέσμη laser. Στο *οπτικό σύστημα*, περιλαμβάνεται το σύστημα *οπτικής διέγερσης* που αποτελείται από δύο έως τρεις πηγές ακτινοβολίας laser, οι οποίες διεγείρουν τα κύτταρα, η ακτινοβολία σκεδάζεται σε παράλληλη και κάθετη κατεύθυνση, ενώ ταυτόχρονα εκπέμπεται και φθορίζουσα ακτινοβολία. Επίσης υπάρχει και το σύστημα *οπτικής συλλογής*, που κατευθύνει το σύνολο της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε ανιχνευτές. Πιο συγκεκριμένα η ακτινοβολία οδηγείται από τους φακούς, μέσω οπτικών ινών, σε φίλτρα και κάτοπτρα και τελικά στους ανιχνευτές συγκεκριμένου μήκους κύματος. Τέλος το *ηλεκτρονικό σύστημα* αποτελείται από τους ανιχνευτές, τους ενισχυτές και επεξεργαστές σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Συγκεκριμένα, το φωτεινό σήμα μετατρέπεται σε ηλεκτρονικό και τελικά σε ψηφιακό, με αποτέλεσμα να προκύπτουν συγκεκριμένες αριθμητικές τιμές για κάθε κύτταρο και τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται με τη μορφή διαγραμμάτων.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ενδοκυτταρικών GSH και ROS χρησιμοποιούνται οι χρωστικές thiol Green Dye και η DCF-DA, αντίστοιχα. Η χρωστική thiol Green Dye, μία μη φθορίζουσα ουσία, συνδέεται απευθείας με τη GSH, με αποτέλεσμα να εκπέμπει έντονο φθορισμό. Απορροφά στα 490nm και εκπέμπει στα 520nm. Αντίθετα, η χρωστική DCF-

DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), αφού εισέρχεται στα κύτταρα, από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν. Αυτό, στη συνέχεια, αφού οξειδωθεί από τις ROS, μετατρέπεται στη φθορίζουσα χρωστική DCF (2,7-dichlorofluorescein), η οποία απορροφά στα 495nm και εκπέμπει στα 529nm. Επομένως, όσο μεγαλύτερος είναι ο φθορισμός της thiol Green Dye και της DCF, τόσο μεγαλύτερα είναι τα επίπεδα των GSH και ROS (Kerasioti et al., 2020).

Πειραματική διαδικασία

Για τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες T₂₅ για την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς MKN-45 και επαρκής αριθμός από πλάκες 6-Well Plate Template. Μετά από θρυψινοποίηση και δημιουργία νέου κυτταρικού αιωρήματος, ακολουθεί η καταμέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Γίνεται αραιώση 1:2 του κυτταρικού αιωρήματος με θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται 10μL ανάμεσα από την καλυπτρίδα και την πλάκα Neubauer. Αφού γίνει η μέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα, υπολογίζεται η ποσότητα κυτταρικού αιωρήματος και θρεπτικού υλικού που θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να περιέχονται 100.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι (well). Τέλος, σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας, τοποθετείται συνολική ποσότητα ίση με 1 mL. Οι πλάκες επωάζονται σε κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

Μετά την επώαση ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων υδατικής φάσης ελιάς αραιωμένα σε θρεπτικό υλικό. Θα χρησιμοποιηθούν τα τέσσερα διαφορετικά δείγματα και θα επιλεχθούν οι συγκεντρώσεις εκείνες, για τις οποίες προέκυψε, από τη μέθοδο XTT, ότι δεν είναι κυτταροτοξικές. Αρχικά παρασκευάζεται το stock διάλυμα με συγκέντρωση 200μL/mL και πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 1:2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τοποθετείται ποσότητα ίση με 1 mL σε κάθε πηγαδάκι. Σε κάθε 6-Well Plate θα μετρηθούν δύο control μεθόδου και τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον για κάθε δείγμα θα χρειαστούν δύο 6-Well Plates, εκ των οποίων η μία θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της γλουταθειόνης (GSH) και η δεύτερη για την μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου

(ROS) και το κάθε δείγμα θα μετρηθεί σε τρεις επαναλήψεις. Τέλος οι πλάκες επωάζονται σε κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

Μετά την επώαση ακολουθεί η προετοιμασία των κυττάρων προκειμένου να γίνει η μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

Γλουταθειόνη (GSH)

Όσον αφορά την πλάκα που θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της GSH, το πρώτο βήμα περιλαμβάνει αφαίρεση του περιεχόμενου υγρού από κάθε πηγαδάκι του 6-Well Plate, πλύση των κυττάρων με PBS, προσθήκη θρυψίνης, αραίωση της με θρεπτικό υλικό (1:5) και τελικά μεταφορά των κυττάρων σε erpendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1.200 rpm, 5°C, 5 min), αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, προσθήκη 1 mL PBS, επαναιώρηση και ξανά φυγοκέντρηση. Επόμενο βήμα είναι η αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, η προσθήκη 1 mL PBS και 5 μ L thiol Green Dye σε κάθε δείγμα, η επαναιώρηση του ιζήματος, η επώαση σε κλίβανο στους 40°C για 30 min, η φυγοκέντρηση (1.200 rpm, 5°C, 5 min), η αφαίρεση του υπερκείμενου, η προσθήκη 300 μ L PBS και η επαναιώρηση του ιζήματος. Τέλος τα δείγματα μετριοούνται στο κυτταρόμετρο, καθώς διατηρούνται στον πάγο.

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Όσον αφορά την πλάκα που θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), το πρώτο βήμα περιλαμβάνει αφαίρεση του περιεχόμενου υγρού από κάθε πηγαδάκι του 6-Well Plate, πλύση των κυττάρων με PBS, προσθήκη 1,5mL από τη χρωστική DCF-DA διαλυμένη σε PBS, με την αναλογία ότι 10 mL PBS αντιστοιχούν σε 5 μ L χρωστικής και επώαση σε κλίβανο, στους 37°C για 45 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε erpendorfs, τα οποία υφίστανται φυγοκέντρηση (1.200 rpm, 5°C, 5 min), αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 300 μ L PBS και το ίζημα επαναιωρείται. Τέλος τα δείγματα μετριοούνται στο κυτταρόμετρο, καθώς διατηρούνται στον πάγο.

3.2.5. Προετοιμασία των κυττάρων για τον προσδιορισμό του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων σε φλάσκες T₂₅. Για κάθε δείγμα απαιτούνται πέντε φλάσκες, εκ των οποίων η μία αποτελεί το control της μεθόδου και οι άλλες τέσσερις αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις που θα μελετηθούν. Οι φλάσκες επωάζονται σε κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

Μετά την επώαση ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων υδατικής φάσης ελιάς αραιωμένα σε θρεπτικό υλικό. Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα της μεγαλύτερης συγκέντρωσης και ακολουθούν αραιώσεις 1:2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες, γίνεται πλύση με PBS και προστίθενται 5 mL θρεπτικού υλικού στην φλάσκα που έχει οριστεί ως control και 5 mL από κάθε μία από τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις αντίστοιχες φλάσκες. Ακολουθεί επώαση σε κλίβανο, στους 37°C για 24 ώρες.

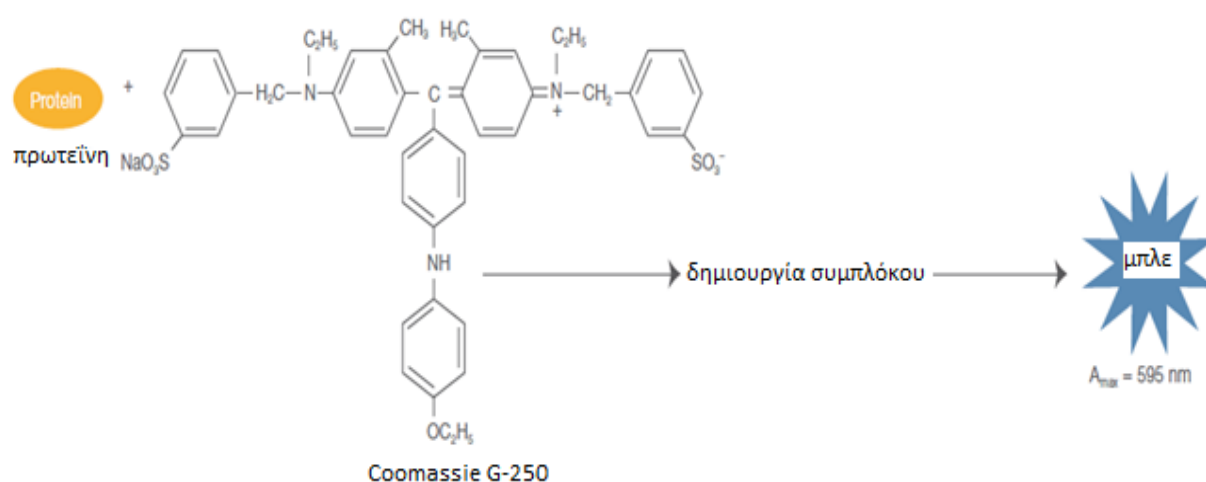
Επόμενο βήμα, για την απομάκρυνση των κυττάρων από τις φλάσκες, είναι η αφαίρεση του περιεχόμενου υγρού από κάθε μία, η πλύση με PBS, η προσθήκη θρυψίνης, η αραιώση της με θρεπτικό υλικό (1:5) και η μεταφορά των κυττάρων σε falcons που υφίστανται φυγοκέντρωση (160g, 5min). Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται PBS και ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρωση. Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου υγρού, προσθήκη 300μL PBS που περιέχουν αναστολείς πρωτεασών, επαναιώρηση και μεταφορά του περιεχομένου σε νέα erpendorfs. Τα κύτταρα υφίστανται λύση με τη βοήθεια υπερήχων (cycle: 0,6 και amplitude: 70%), το κυτταροπλασματικό αιώρημα φυγοκεντρείται (10.000 rpm, 4°C, 20 min) και το υπερκείμενο αραιώνεται με PBS, σε αναλογία 1:10.

3.2.6. Μέθοδος Bradford - Προσδιορισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης που περιέχεται σε κυτταρικά εναιωρήματα. Βασίζεται

στην ένωση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford, με τα αμινοξέα των κυτταρικών πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός χρωμογόνου προϊόντος με έντονο μπλε χρώμα, που απορροφά στα 595nm. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση του δείγματος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στα κύτταρα (Bradford, 1976). Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, με εξίσωση της μορφής $y = ax + b$.



Εικόνα 24 : Η αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με τα πρωτεϊνικά αμινοξέα

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήριο Bradford

Η παρασκευή του αντιδραστηρίου Bradford περιλαμβάνει την προσθήκη 100mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, σε 50mL αιθανόλης 95%. Στη συνέχεια προστίθενται 100mL φωσφορικού οξέος 85% w/v, το διάλυμα αναδεύεται και προστίθεται νερό μέχρι τελικού όγκου 1L. Το αντιδραστήριο αυτό είναι φωτοευαίσθητο και απαιτεί φιλτράρισμα. Για μέτρηση στα 595nm αποδεκτό είναι το εύρος απορροφήσεων 0,500-0,600. Κάθε φορά που παρασκευάζεται καινούριο αντιδραστήριο δημιουργείται και

νέα πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης στα δείγματα, σε 20μL από κάθε ένα αραιωμένο κυτταρικό αιώρημα, με δύο επαναλήψεις για το control και για κάθε συγκέντρωση και σε 20μL PBS για το τυφλό προστίθεται 1mL από το αντιδραστήριο Bradford. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 20 min σε απόλυτο σκοτάδι. Τέλος τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

3.2.7. Μέθοδος TBARS - Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

Αρχή μεθόδου

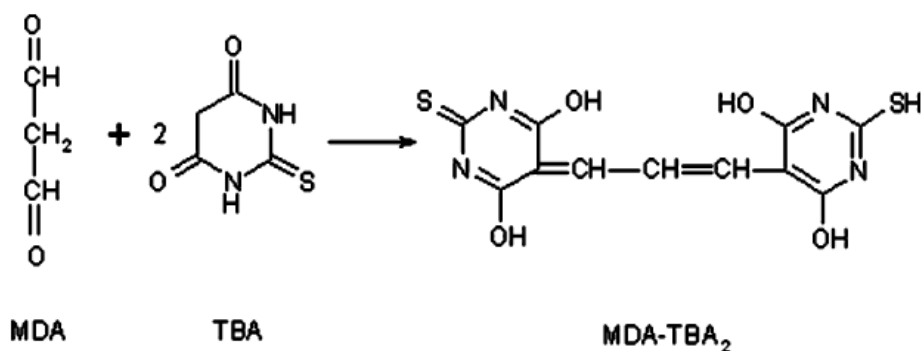
Πρόκειται για μία φωτομετρική μέθοδο που στοχεύει στον προσδιορισμό του βαθμού λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών (PUFAs) οξειδώνονται και σχηματίζονται ενεργά και ασταθή υπεροξείδια των λιπιδίων, δηλαδή ρίζες. Λόγω της ασταθούς δομής τους, διασπώνται και σχηματίζεται η μαλονδιαλδεΰδη (MDA), η οποία μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά μέσω της αντίδρασης της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΰδης, η οποία συμπλοκοποιείται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, σε αναλογία 1:2. Όταν το περιβάλλον οξειδωτικού στρες παύει να υπάρχει, αφού έχουν προστεθεί αντιοξειδωτικά μόρια, τότε τα επίπεδα των TBARS δεν έχουν αυξημένη συγκέντρωση. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται στα 530 nm (Keles et al., 2001).

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = [(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 0,156] * (3400 / x),$$

όπου $A_{\text{δείγματος}}$ και $A_{\text{τυφλού}}$ είναι η οπτική απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα, x είναι η ποσότητα του κυτταρικού

αιωρήματος που απαιτείται ούτως ώστε να περιέχονται περισσότερα από 30μg ολικής πρωτεΐνης με βάση τη μέθοδο Bradford, ο αριθμός 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεΐδης (μmol/L) και ο αριθμός 3400 είναι ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε μL.



Εικόνα 25 : Το προϊόν αντίδρασης της MDA με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Ligor et al., 2012)

Πειραματική διαδικασία

Αφού έχει υπολογιστεί, με τη μέθοδο Bradford, η ολική ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχεται στα κύτταρα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon τοποθετείται, η απαιτούμενη ποσότητα κυτταρικού αιωρήματος, ώστε να περιέχονται περισσότερα από 30μg ολικής πρωτεΐνης, και PBS μέχρι τελικού όγκου 400μL. Σε κάθε πείραμα, για κάθε δείγμα, πραγματοποιούνται δύο επαναλήψεις, όπως και για το τυφλό, για το οποίο χρησιμοποιούνται 400μL PBS. Προστίθενται 500μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl και 500μL τριχλωροξικού οξέος (TCA) 35%, ακολουθεί ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, προσθήκη 1 mL διαλύματος θειικού νατρίου (Na₂SO₄) και TBA, ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45 min. Τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο για περίπου 5 λεπτά, προστίθεται 1 mL διαλύματος TCA 70%, αναδεύονται και μεταφέρεται 1mL από το κάθε ένα σε erpendorfs, τα οποία φυγοκεντρούνται (11.200 g, 25°C, 3 min). Η οπτική απορρόφηση μετριέται στα 530 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

3.2.8. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

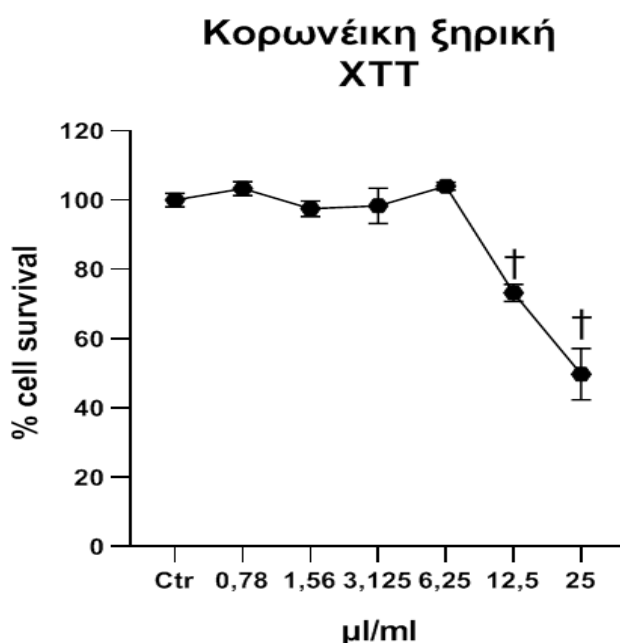
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test σε συνδυασμό με το Mann-Whitney test, με χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 8.0.1. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (+_) sem.

4. Αποτελέσματα

4.1. Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων

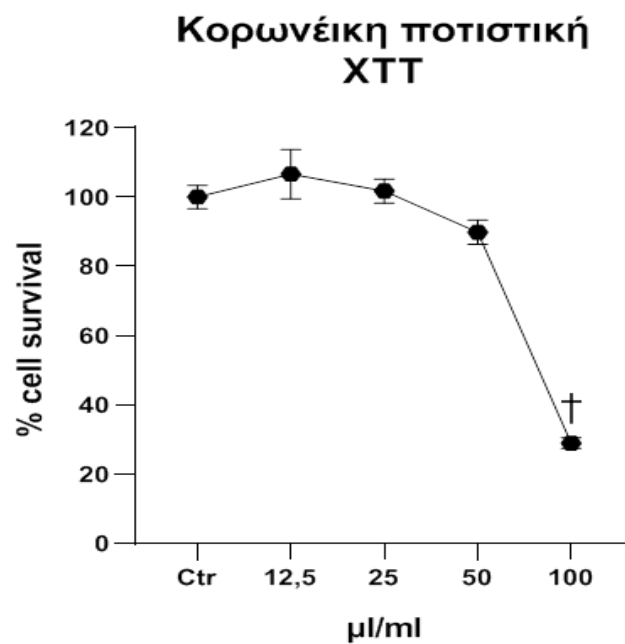
Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν διπλή δράση, αφού σε χαμηλές συγκεντρώσεις λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά, ενώ σε υψηλές προκαλούν αυξημένη οξείδωση που οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα (Skaperda et al., 2021). Με τη μέθοδο ΧΤΤ προσδιορίστηκαν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος, προκειμένου εκείνες να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα εκτίμησης βιοδραστικότητας. Η συγκέντρωση εκείνη στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, θεωρήθηκε κυτταροτοξική.

Στο *Διάγραμμα 1* παρουσιάζονται για το δείγμα «Κορωνέικη ξηρική», τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν επώαστηκε με το δείγμα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στη συγκέντρωση 12,5 $\mu\text{L/mL}$. Έτσι, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα πειράματα είναι 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$.



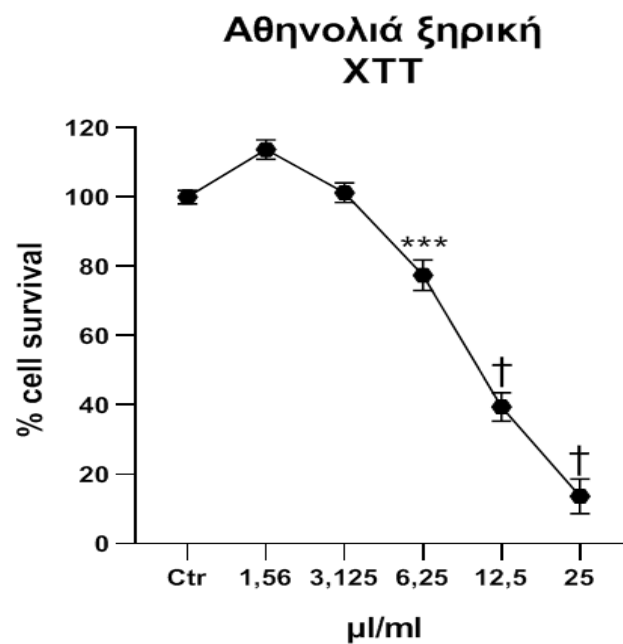
Διάγραμμα 1: Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$) στην κυτταρική σειρά MKN-45 για το δείγμα «Κορωνέικη ξηρική» († $p < 0,0001$)

Στο *Διάγραμμα 2* παρουσιάζονται για το δείγμα «Κορωνέικη ποτιστική», τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν επωάστηκε με το δείγμα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στη συγκέντρωση 100 $\mu\text{L/mL}$. Έτσι, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα πειράματα είναι 6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$.



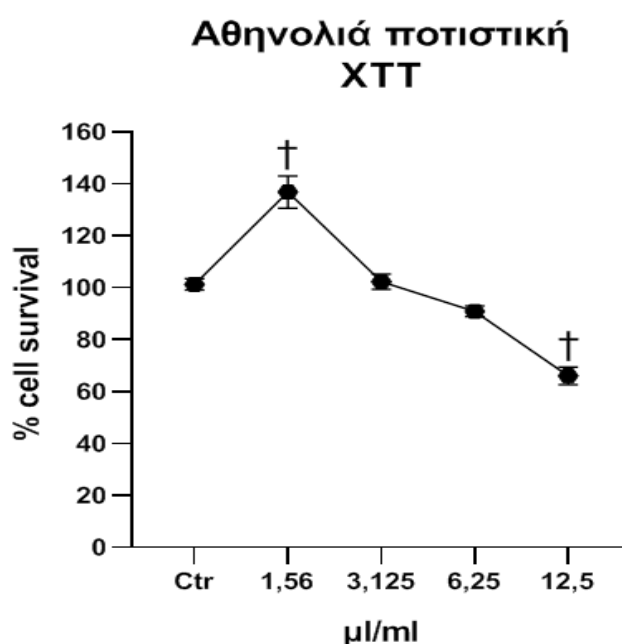
Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$) στην κυτταρική σειρά MKN-45 για το δείγμα «Κορωνέικη ποτιστική» († $p < 0,0001$)

Στο *Διάγραμμα 3* παρουσιάζονται για το δείγμα «Αθηνολιά ξηρική», τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν επωάστηκε με το δείγμα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στη συγκέντρωση 6,25 $\mu\text{L/mL}$. Έτσι, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα πειράματα είναι 0,39 $\mu\text{L/mL}$, 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$ και 3,125 $\mu\text{L/mL}$.



Διάγραμμα 3: Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (0,39 $\mu\text{L/mL}$, 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$ και 3,125 $\mu\text{L/mL}$) στην κυτταρική σειρά MKN-45 για το δείγμα «Αθηνολιά ξηρική» (*** $p < 0,0004$, † $p < 0,0001$)

Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται για το δείγμα «Αθηνολιά ποτιστική», τα ποσοστά επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control), η οποία δεν επωάστηκε με το δείγμα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στη συγκέντρωση 12,5 $\mu\text{L/mL}$. Έτσι, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα πειράματα είναι 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκέντρωση 1,56 $\mu\text{L/mL}$ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα, τα φυσικά αντιοξειδωτικά ασκούν τις προστατευτικές τους ιδιότητες, είτε εξουδετερώνοντας άμεσα ελεύθερες ρίζες, είτε μέσω επαγωγής ορμονικών μηχανισμών (Skaperda, Kyriazis, et al., 2021). Έτσι, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία οδηγούν σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες, όπως αντιοξειδωτικά ένζυμα και αυξητικούς παράγοντες (Mattson, 2008).

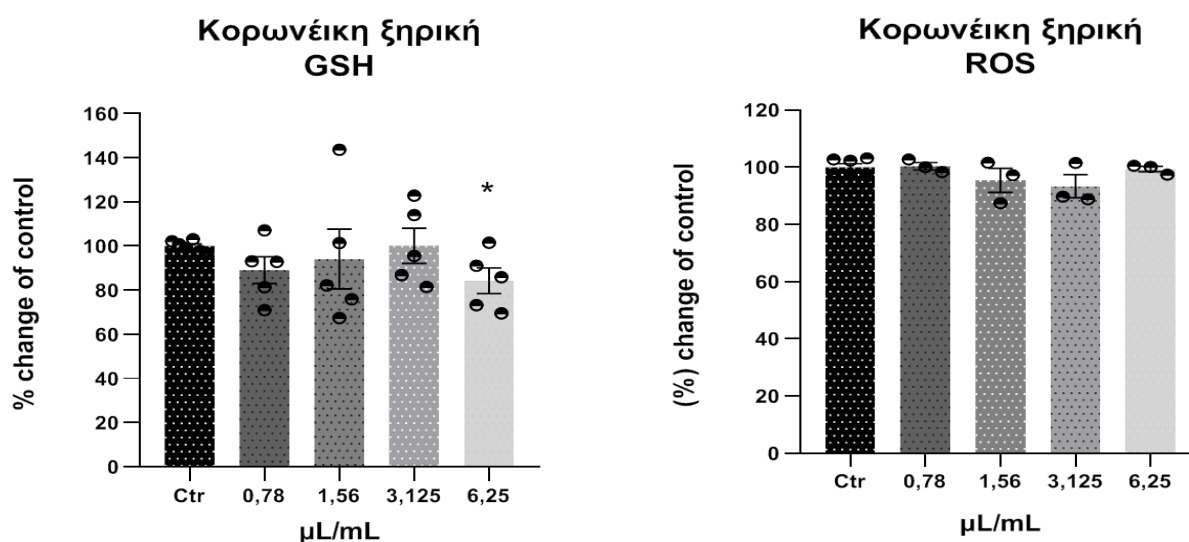


Διάγραμμα 4: Προσδιορισμός μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$) στην κυτταρική σειρά MKN-45 για το δείγμα «Αθηνολιά ποτιστική» († $p < 0,0001$)

4.2. Εκτίμηση επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής

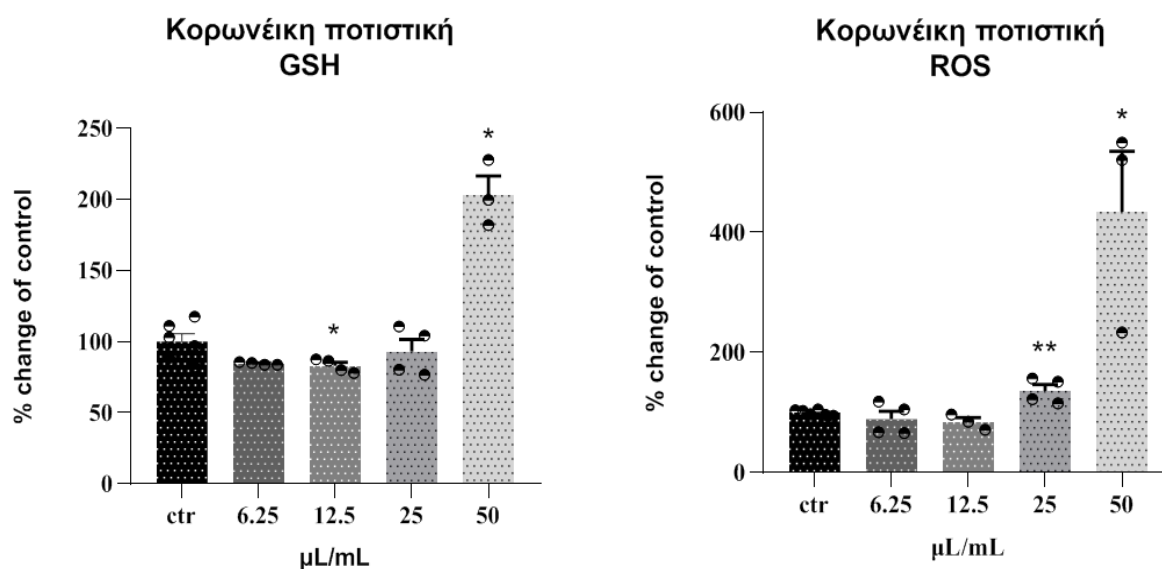
Με κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS για κάθε δείγμα, μετά την επώαση των κυττάρων MKN-45, για 24h, με αυτά.

Στο *Διάγραμμα 5* φαίνεται ότι το δείγμα «Κορωνέικη ξηρική» προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH, συγκριτικά με το control, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (6,25 $\mu\text{L/mL}$). Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, σε καμία συγκέντρωση.



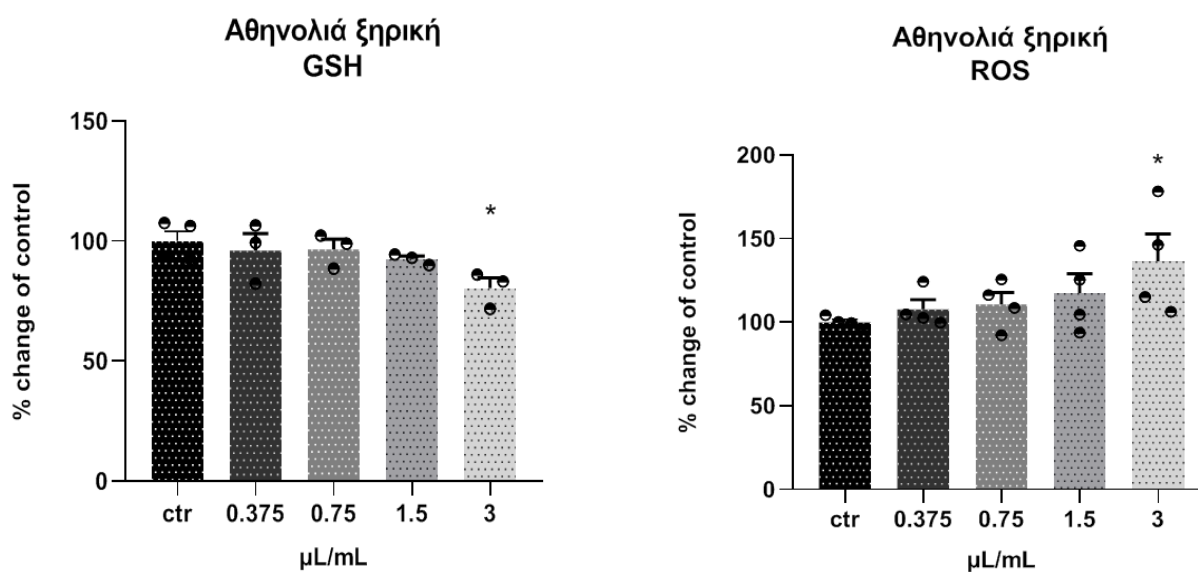
Διάγραμμα 5: Επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ξηρική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$), στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

Στο *Διάγραμμα 6* φαίνεται ότι το δείγμα «Κορωνέικη ποτιστική» προκάλεσε, στη συγκέντρωση 12,5 $\mu\text{L/mL}$, στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH και καμία μεταβολή στα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με το control. Επίσης, στη συγκέντρωση 25 $\mu\text{L/mL}$, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων ROS και καμία μεταβολή στα επίπεδα της GSH. Τέλος, στη συγκέντρωση 50 $\mu\text{L/mL}$, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων τόσο της GSH όσο και των ROS.



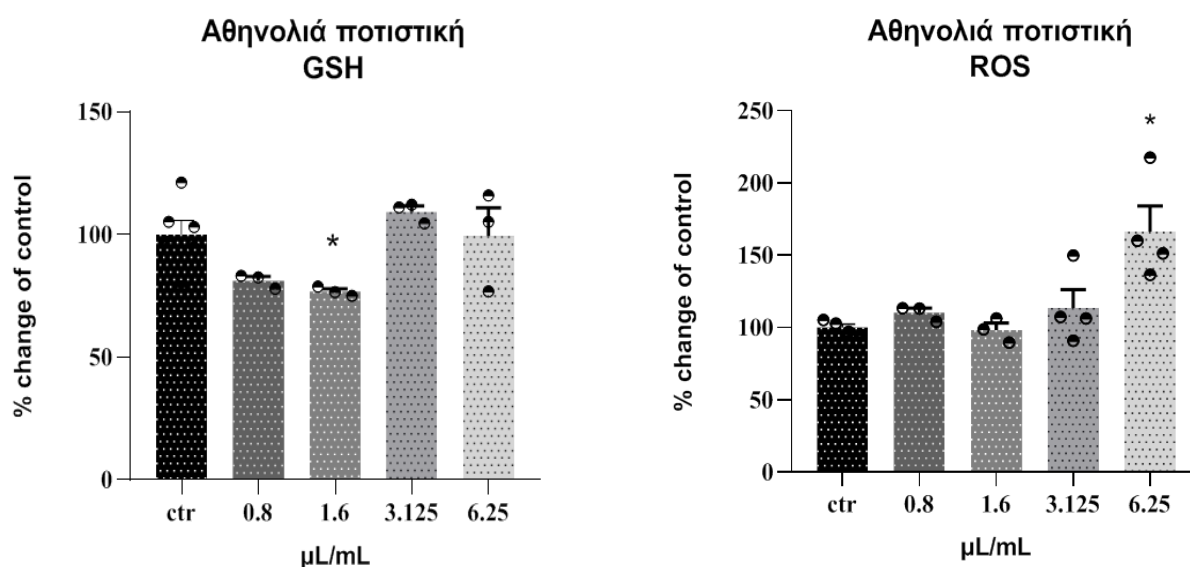
Διάγραμμα 6: Επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$), στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Στο Διάγραμμα 7 φαίνεται ότι το δείγμα «Αθηνολιά ξηρική» προκάλεσε, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (3,125 $\mu\text{L/mL}$) στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH και αύξηση των επιπέδων των ROS, συγκριτικά με το control.

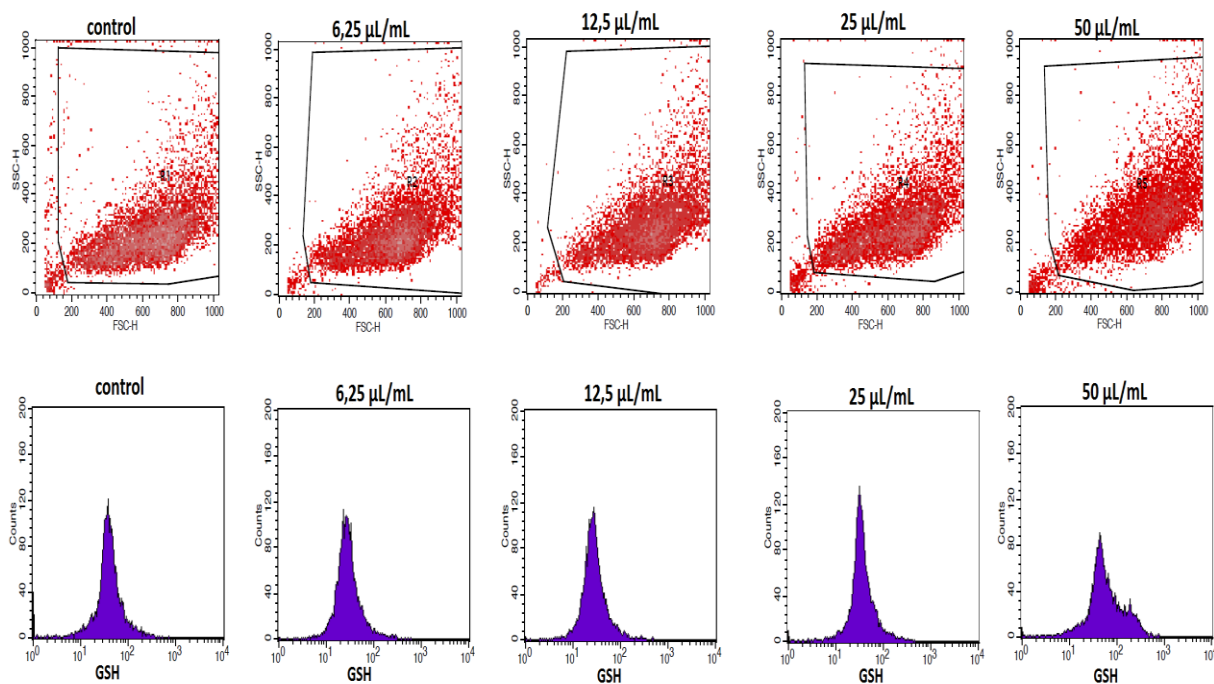


Διάγραμμα 7: Επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ξηρική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,39 $\mu\text{L/mL}$, 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$ και 3,125 $\mu\text{L/mL}$), στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

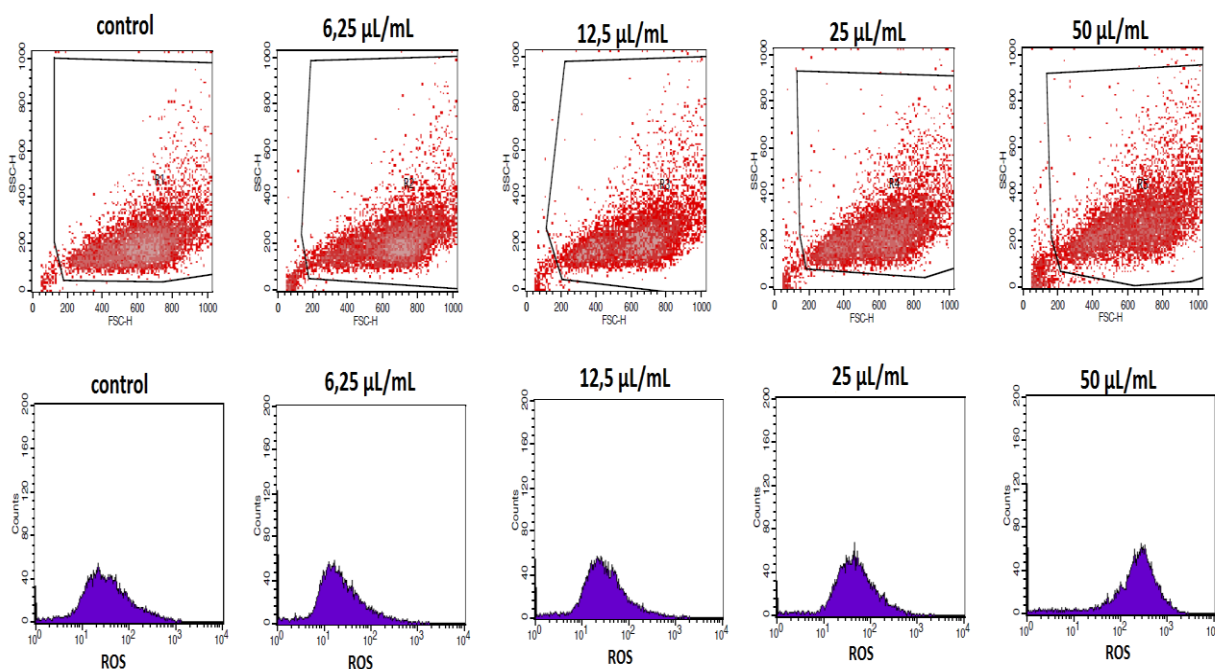
Στο *Διάγραμμα 8* φαίνεται ότι το δείγμα «Αθηνολιά ποτιστική» προκάλεσε, στη συγκέντρωση 1,56 $\mu\text{L/mL}$, στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH και καμία μεταβολή στα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με το control. Επιπλέον, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (6,25 $\mu\text{L/mL}$), δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στα επίπεδα της GSH αλλά αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με το control.



Διάγραμμα 8: Επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ποτιστική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$), στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS, στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)



Διάγραμμα 9: Ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής για την εκτίμηση της επίδρασης του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική» σε 4 διαφορετικές, μη κυτταροτοξικές, συγκεντρώσεις (6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$) στα επίπεδα της GSH, στα κύτταρα MKN-45



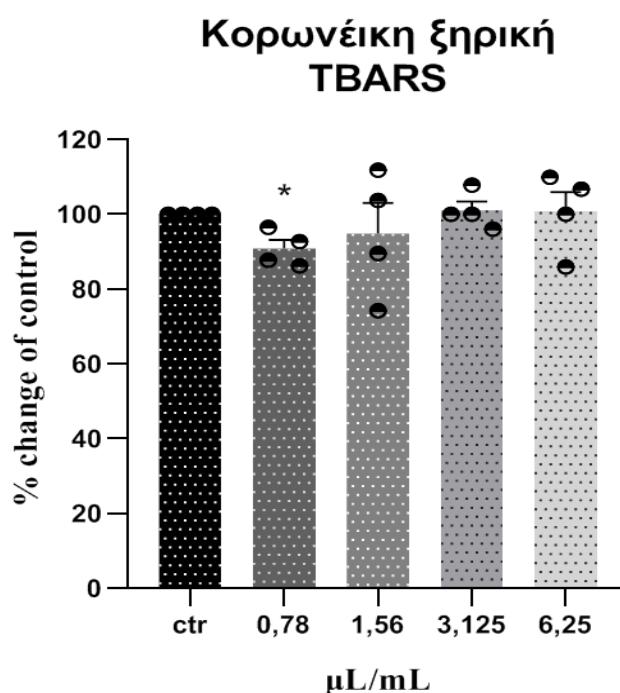
Διάγραμμα 10: Ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής για την εκτίμηση της επίδρασης του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική» σε 4 διαφορετικές, μη κυτταροτοξικές, συγκεντρώσεις (6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$) στα επίπεδα των ROS, στα κύτταρα MKN-45

Τα ιστογράμματα στο πάνω μέρος του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

4.3. Εκτίμηση επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

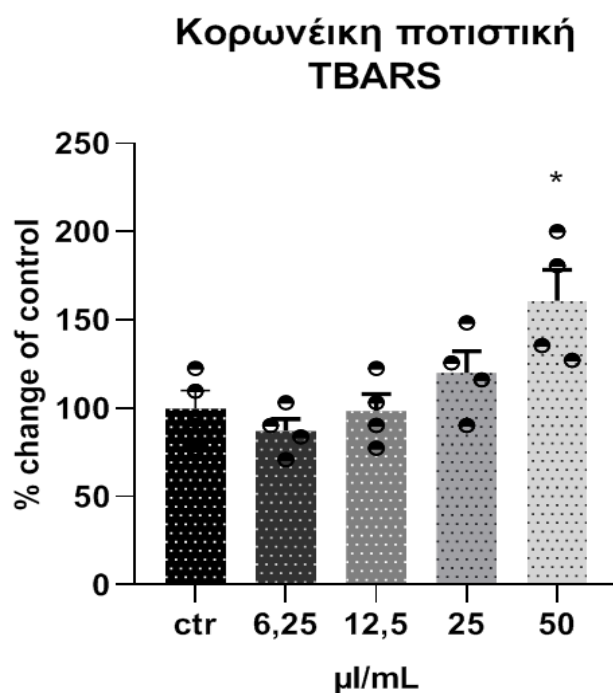
Με τη μέθοδο TBARS, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης μετά την επώαση των κυττάρων MKN-45, για 24 h, με το κάθε δείγμα.

Στο *Διάγραμμα 11* παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS, συγκριτικά με το control, μετά την επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ξηρική», στη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (0,78 $\mu\text{L/mL}$).



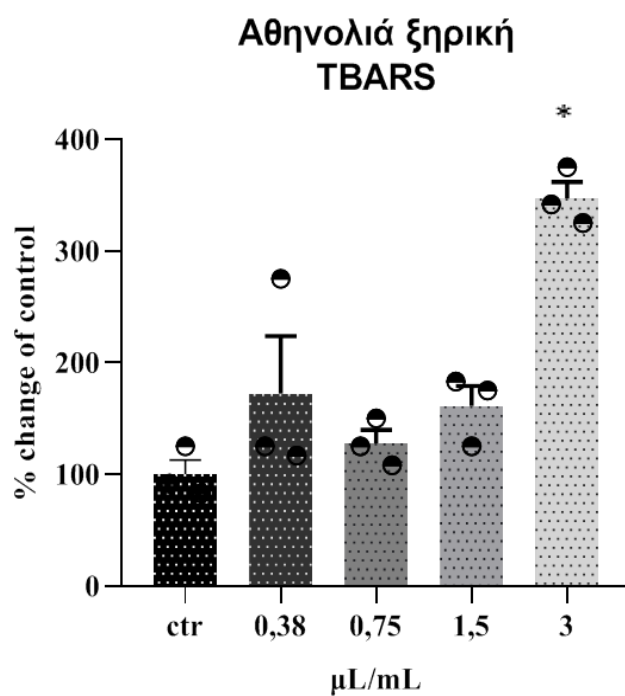
Διάγραμμα 11: Επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ξηρική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$), στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

Στο *Διάγραμμα 12* παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS, συγκριτικά με το control, μετά την επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική», στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (50 $\mu\text{L/mL}$).



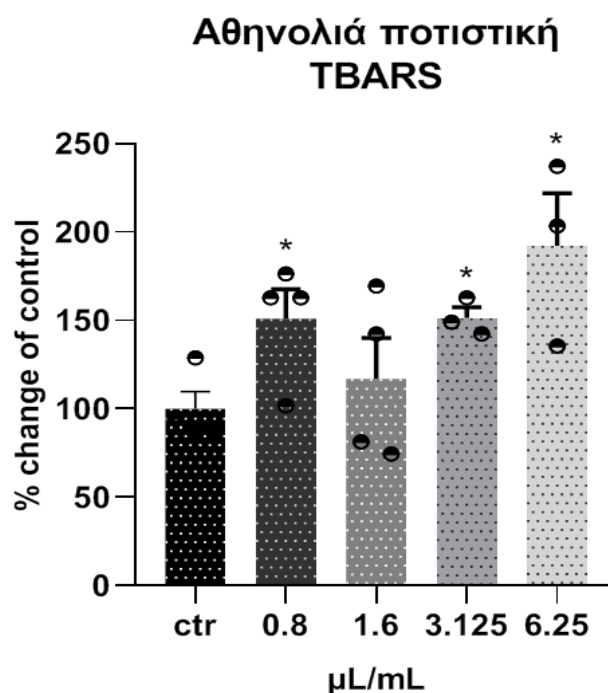
Διάγραμμα 12: Επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (6,25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$ και 50 $\mu\text{L/mL}$), στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

Στο *Διάγραμμα 13* παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα TBARS, συγκριτικά με το control, μετά την επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ξηρική», στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (3,125 $\mu\text{L/mL}$).



Διάγραμμα 13: Επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ξηρική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,39 $\mu\text{L/mL}$, 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$ και 3,125 $\mu\text{L/mL}$), στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

Στο *Διάγραμμα 14* παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS, συγκριτικά με το control, μετά την επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ποτιστική» στις συγκεντρώσεις 0,78 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$.



Διάγραμμα 14: Επίδραση του δείγματος «Αθηνολιά ποτιστική» σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,78 $\mu\text{L/mL}$, 1,56 $\mu\text{L/mL}$, 3,125 $\mu\text{L/mL}$ και 6,25 $\mu\text{L/mL}$), στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), στην κυτταρική σειρά MKN-45 (* $p < 0,05$)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα δείγματα υδατικής φάσης ελαιόκαρπου, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ανήκουν στις ποικιλίες «Κορωνέικη» και «Αθηνολιά», και προέρχονται τόσο από ξηρικές όσο και από ποτιστικές καλλιέργειες. Επίσης διαφέρουν και ως προς το υψόμετρο, με τις ξηρικές να έχουν καλλιεργηθεί σε υψηλότερο υψόμετρο (580m και 630m αντίστοιχα) από τις ποτιστικές (152m και 270m αντίστοιχα).

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι σημαντικά πλούσιες σε πολυφαινόλες και ιδιαίτερα στην υδροξυτυροσόλη και στην ελευρωπαΐνη. Παρά τα υψηλά επίπεδα της υδροξυτυροσόλης τόσο στις ελιές όσο και στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, η βιοδιαθεσιμότητα της στους ανθρώπους έχει αποδειχτεί μόνο στο ελαιόλαδο, με τις επιτραπέζιες ελιές να μην έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα (Accardi et al., 2016). Σύμφωνα με μελέτη που έγινε από τους Mougίου et al, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης (HT) αυξάνεται ραγδαία στον μαύρο ώριμο ελαιόκαρπο, εξαιτίας του καταβολισμού της ελευρωπαΐνης. Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του δέντρου, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, καθώς αυτό είναι ευάλωτο στην προσβολή από παθογόνα και έντομα. Αυτό πλέον δεν χρειάζεται, όταν το δέντρο είναι πιο ώριμο (Mougίου et al., 2018).

Μελετώντας τη χημική σύσταση των ελαιόκαρπων, σύμφωνα με έρευνα που έγινε από τους Mitsopoulos et al, βρέθηκε ότι οι πράσινοι και οι μαύροι ελαιόκαρποι, τόσο της ποικιλίας «Κορωνέικη» όσο και της «Αθηνολιά», και των δύο ετών (διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια), περιείχαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, μεταξύ των φαινολικών ενώσεων, την ελευρωπαΐνη, τη βερμπασκοσίδη και τη ρουτίνη. Συγκεκριμένα, στους πράσινους ελαιόκαρπους και των δύο ετών, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, βρέθηκαν η υδροξυτυροσόλη, το χλωρογενικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, η 7-O-γλυκοσίδη της λουτεολίνης, η 4-O-γλυκοσίδη της λουτεολίνης και η λουτεολίνη. Στους μαύρους ελαιόκαρπους, της πρώτης χρονιάς, βρέθηκαν σε μικρότερα ποσοστά το γαλλικό οξύ, η τυροσόλη, η 4-O-γλυκοσίδη της λουτεολίνης και η λουτεολίνη. Τέλος, στους μαύρους ελαιόκαρπους της δεύτερης χρονιάς, βρέθηκαν η υδροξυτυροσόλη, το π-κουμαρικό οξύ και η 4-O-γλυκοσίδη της λουτεολίνης. Όσον αφορά τις μεταξύ τους διαφορές

παρατηρήθηκε, ότι μεταξύ πράσινων ελαιόκαρπων, η ποικιλία «Αθηνολιά» περιείχε την βερμπασκοσίδη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με την ποικιλία «Κορωνέικη». Επίσης στους μαύρους ελαιόκαρπους της πρώτης χρονιάς, στη ποικιλία «Αθηνολιά» η ελευρωπαΐνη και η βερμπασκοσίδη βρίσκονταν σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την «Κορωνέικη». Τέλος, οι μαύροι ελαιόκαρποι της δεύτερης χρονιάς της ποικιλίας «Κορωνέικη», περιείχαν ελευρωπαΐνη και ρουτίνη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την «Αθηνολιά» (Mitsopoulos et al., 2016). Μίγμα πράσινων και μαύρων ελιών χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα στην παρούσα εργασία, υποδηλώνοντας ότι κάθε μίγμα περιέχει συνδυασμό των παραπάνω πολυφαινόλων.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε ότι η ποικιλία «Κορωνέικη ξηρική (580m)» προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του αντιοξειδωτικού μορίου GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη) στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (6,25 $\mu\text{L/mL}$), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Επίσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS, στη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (0,78 $\mu\text{L/mL}$), στην οποία δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή στα επίπεδα των GSH και ROS. Τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των GSH και ROS συμβαδίζουν με έρευνα των Goutzourelas et al, που έδειξαν ότι οι αλλαγές στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς δεν συνδυάζονται απαραίτητα και με αλλαγή στα επίπεδα των ROS (Goutzourelas et al., 2015). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από έρευνα που έγινε από τους Skaperda et al, σχετικά με την επίδραση εκχυλισμάτων βοτανικών αφεψημάτων (πλούσια σε φαινολικές ενώσεις) στην οξειδοαναγωγική κατάσταση καρκινικών-ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι κανένα από τα εκχυλίσματα δεν επηρέασε τα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, όμως μείωσαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH. Έχει αναφερθεί ότι ένα μόριο στόχευσης στην αντικαρκινική θεραπεία είναι η GSH. Έχει προταθεί ότι η μείωση των επιπέδων της GSH θα μπορούσε να συμβάλει στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, λόγω της αδυναμίας τους να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες (Skaperda et al., 2021). Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες έχουν διπλή δράση, αφού σε χαμηλές συγκεντρώσεις

λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά μόρια, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις δρουν ως προ-οξειδωτικά. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη μείωση της GSH στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, καθώς καταναλώνεται στο να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες (Skaperda et al., 2021).

Όσον αφορά την ποικιλία «Κορωνέικη ποτιστική (152m)» παρατηρήθηκε μείωση της GSH και στη συνέχεια αύξηση της, συγκριτικά με το control, αύξηση των ROS στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και αύξηση του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης στην μεγαλύτερη μόνο. Τα επίπεδα των ROS αυξάνονται ήδη από την συγκέντρωση 25 $\mu\text{L/mL}$, αποτέλεσμα που μπορεί να συσχετιστεί με μελέτες που έδειξαν ότι η ελευρωπαΐνη προκάλεσε παραγωγή ROS σε καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε οξειδωτικό στρες (Katsoulis, 2016). Μάλιστα, η αύξηση τους είναι τόσο μεγάλη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, που συνδέεται πιθανώς με την προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινόλων και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των TBARS. Επιπλέον, η αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου προσομοιάζει και με τα αποτελέσματα μίας άλλης έρευνας, που έγινε από τους Lecci et al, σχετικά με την χημειοθεραπευτική δράση εκχυλισμάτων από λύματα ελαιολαδιού, που αποτελούν σημαντική πηγή βιοενεργών πολυφαινόλων. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ελληνικές και ιταλικές ποικιλίες ελιάς, μεταξύ των οποίων και η «Κορωνέικη» και αποδείχτηκε ότι κάποιες βιοδραστικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων η βερμπασκοσίδη και η τυροσόλη, εμφάνισαν προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή οδήγησαν στην παραγωγή ROS και τελικά στην πρόκληση απόπτωσης στα UV κατεστραμμένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (HEKa) (Lecci et al., 2021). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα προσπαθούν να αμυνθούν στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται, μέσω αναγέννησης της GSH. Ωστόσο δεν τα καταφέρνουν, καθώς βλέπουμε αύξηση των επιπέδων ROS και TBARS.

Σύμφωνα με έρευνες, οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου και ιδιαίτερα η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη, οι οποίες απαντώνται στην υδατική φάση που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους, ασκούν και αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων (Toric et al., 2019). Επιπρόσθετα, έρευνα που έγινε από τους L.

Sun et al., έδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη προκάλεσε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, μέσω αυξημένης παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), ασκώντας έτσι αντικαρκινική δράση (L. Sun et al., 2014). Αντίστοιχη έρευνα που έγινε από τους Yan et al, έδειξε ότι η επώαση ηπατικών καρκινικών κυττάρων με ελεωρωπαΐνη προκάλεσε αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS (Yan et al., 2015). Μάλιστα σε μία άλλη έρευνα των Acquavina et al, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, προέκυψε το ίδιο συμπέρασμα και επισημάνθηκε ότι η επώαση των καρκινικών κυττάρων με ελεωρωπαΐνη έδειξε προ-οξειδωτική δράση, ενώ η επώαση των μη καρκινικών κυττάρων έδειξε αντιοξειδωτική δράση (Acquavina et al., 2012). Έτσι γίνεται φανερό πως η ελεωρωπαΐνη μπορεί να ασκήσει προ-οξειδωτική ή αντιοξειδωτική δράση ανάλογα με το είδος των κυττάρων (Shamshoum et al., 2017). Είναι πιθανό λοιπόν, οι παραπάνω μεταβολές στους δείκτες οξειδωτικού στρες, στην παρούσα εργασία, να οφείλονται στη δράση των πολυφαινόλων, όπως της ελεωρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης.

Συγκρίνοντας την επίδραση του δείγματος «Κορωνέικη ξηρική (580m)» με εκείνη του δείγματος «Κορωνέικη ποτιστική (152m)», θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η έλλειψη νερού έχει σημαντικές επιπτώσεις στο ελαιόδεντρο και αυτές σχετίζονται και με οξειδωτικά φαινόμενα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση έχει η «Κορωνέικη ποτιστική», καθώς επάγει τα επίπεδα ROS και TBARS, κάτι το οποίο δεν προκάλεσε η «Κορωνέικη ξηρική». Παρά το γεγονός ότι είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η «Κορωνέικη» σε συνθήκες ξηρασίας και μεγάλου υψομέτρου (Theodosi et al., 2021), (Banerjee & Roychoudhury, 2019) έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (Denaxa et al., 2020) και σε εκχύλισμα ελαίου (Vidal et al., 2019), στην υδατική φάση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία δεν είναι γνωστή η σύσταση σε πολυφαινόλες.

Η ποικιλία «Αθηνολιά ξηρική (630m)» προκάλεσε στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (3,125 $\mu\text{L/mL}$) στατιστικά σημαντική μείωση της GSH, αύξηση των ROS και αύξηση του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) στα καρκινικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι οι βιοφαινολικές ενώσεις βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρεντερικού συστήματος

που βρίσκεται σε κίνδυνο από την επιβλαβή δράση των δραστικών μορφών που σχηματίζονται στο στομάχι και στα έντερα εξαιτίας των συστατικών της διατροφής. Παρ' όλα αυτά η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων βιοφαινολών μέσω διατροφής ή συμπληρωμάτων μπορεί να οδηγήσει στο αντίθετο αποτέλεσμα (Kouka et al, 2020). Τέτοιου είδους προ-οξειδωτική δράση φαίνεται να μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα σύμφωνα με μελέτη των Günes-Bayir et al, όπου έδειξαν ότι η καρβακρόλη (φαινολική ένωση), συστατικό πολλών φαρμακευτικών φυτών, αύξησε τα επίπεδα των ROS και μείωσε την γλουταθειόνη, αυξανόμενη της συγκέντρωσης, σε ανθρώπινα κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος (AGS) (Günes-Bayir et al., 2017).

Συγκρίνοντας την επίδραση που έχει το δείγμα «Κορωνέικη ξηρική» με εκείνη του δείγματος «Αθηνολιά ξηρική», θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργητικών ποικιλιών, σχετικά με την ικανότητα προσαρμογής τους στη χαμηλή διαθεσιμότητα σε νερό, με την «Κορωνέικη» να θεωρείται περισσότερο ανθεκτική στη ξηρασία από την «Αθηνολιά» (Chartzoulakis et al., 1999). Αυτό συνεπάγεται την καλύτερη απόκριση της στο οξειδωτικό στρες, μέσω ανάπτυξης αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Όμως από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι η «Αθηνολιά ξηρική» εκδηλώνει ισχυρότερη προ-οξειδωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα, γιατί επάγει τα επίπεδα των ROS και TBARS και ταυτόχρονα μειώνει την GSH, σε αντίθεση με την «Κορωνέικη ξηρική» που προκάλεσε μόνο μείωση της GSH.

Τέλος, το δείγμα «Αθηνολιά ποτιστική (270m)» προκάλεσε ταυτόχρονη αύξηση των ROS και των TBARS στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ τα TBARS είχαν αυξηθεί ήδη από τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η γλουταθειόνη δεν μειώνεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, αλλά σε μικρότερη, στην οποία όμως δεν παρουσιάζεται μεταβολή στις ROS. Αυτό θα μπορούσε να συνδυαστεί με τον ισχυρισμό για ύπαρξη ουσιών, που επηρεάζουν τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και αποτελούν πιθανή αντικαρκινική θεραπεία (Skaperda et al., 2021). Σύμφωνα με μελέτες, (Mitsopoulos et al., 2016), (Agiomyrgianaki et al., 2012), η περιεκτικότητα τόσο των πράσινων όσο και των μαύρων ελαιόκαρπων της ποικιλιάς «Αθηνολιά» σε ολικές πολυφαινόλες είναι

μεγαλύτερη απ' ότι της ποικιλίας «Κορωνέικη». Τα δεδομένα αυτά μπορούν να δικαιολογήσουν ότι η «Αθηνολιά ποτιστική» έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με την «Κορωνέικη ποτιστική» αλλά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Συγκρίνοντας την «Αθηνολιά ξηρική (630m)» με την «Αθηνολιά ποτιστική (270m)», δεν παρατηρούνται τόσο σημαντικές διαφορές όσο στην ποικιλία «Κορωνέικη», γιατί και στις δύο περιπτώσεις οι δείκτες GSH, ROS και TBARS μεταβλήθηκαν με όμοιο πρότυπο. Αυτό πιθανώς δείχνει ότι στη συγκεκριμένη ποικιλία, οι παράγοντες, ξηρασία και υψόμετρο, δεν επηρεάζουν σημαντικά τη βιοδραστικότητα των ουσιών στην υδατική φάση του ελαιόκαρπου.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα δείγματα των υδατικών φάσεων ελιάς των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Αθηνολιά», τόσο οι ξηρικές μεγάλου υψομέτρου, όσο και οι ποτιστικές χαμηλού υψομέτρου, παρουσιάζουν πιθανώς αντικαρκινική δράση. Ωστόσο στην ποικιλία «Κορωνέικη» η ποτιστική ήταν αυτή που εκδήλωσε μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση, ενώ στην ποικιλία «Αθηνολιά» φάνηκε ότι οι παράγοντες, ξηρασία και υψόμετρο, δεν επηρεάζουν σημαντικά στη βιοδραστικότητα των υδατικών φάσεων. Συγκρίνοντας τις δύο ποικιλίες, φάνηκε ότι η «Αθηνολιά» ήταν περισσότερο δραστική, καθώς μείωσε τη GSH και παράλληλα αύξησε τα επίπεδα των ROS και TBARS σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ'ότι η «Κορωνέικη». Ωστόσο, για την επιβεβαίωση της αντικαρκινικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων της παρούσας εργασίας, θα πρέπει να γίνουν αντίστοιχα πειράματα σε μη καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς και in-vivo μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Accardi, G., Aiello, A., Gargano, V., Gambino, C. M., Caracappa, S., Marineo, S., Vesco, G., Carru, C., Zinellu, A., Zarccone, M., Caruso, C., & Candore, G. (2016). Nutraceutical effects of table green olives: A pilot study with Nocellara del Belice olives. *Immunity and Ageing*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0067-y>
2. Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., et al. (2012) Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int. J. Oncol.* 41, 31–38. Jul
3. AG, N., Y, X., L, H., & S, R. (2020). Antioxidant Functionality in Plants and Plant Sourced Biomaterials. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism*, 7(3). <https://doi.org/10.26420/austijnutrmatab.2020.1081>
4. Agiomyrgianaki, A., Petrakis, P. v., & Dais, P. (2012). Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis. *Food Chemistry*, 135(4), 2561–2568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.050>
5. Ahmad, S., Khan, H., Shahab, U., Rehman, S., Rafi, Z., Khan, M. Y., Ansari, A., Siddiqui, Z., Ashraf, J. M., Abdullah, S. M. S., Habib, S., & Uddin, M. (2017). Protein oxidation: An overview of metabolism of sulphur containing amino acid, Cysteine. In *Frontiers in Bioscience - Scholar* (Vol. 9, Issue 1, pp. 71–87). Frontiers in Bioscience. <https://doi.org/10.2741/S474>
6. Akhigbe, R., & Ajayi, A. (2021). The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. In *Lipids in Health and Disease* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01435-7>
7. Ali Pambuk, C. I. (2018). Free Radicals: The types generated in biological system. *MOJ Cell Science & Report*, 5(3). <https://doi.org/10.15406/mojcsr.2018.05.00118>
8. Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2019). Role of glutathione in plant abiotic stress tolerance. In *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms* (pp. 159–172). Taylor and Francis. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch7>
9. Bashan, N., Kovsky, J., Kachko, I., Ovadia, H., & Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen

- species. In *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 1, pp. 27–71).
<https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2008>
10. Bertoni, S., Albertini, B., Facchini, C., Prata, C., & Passerini, N. (2019). Glutathione-loaded solid lipid microparticles as innovative delivery system for oral antioxidant therapy. *Pharmaceutics*, 11(8).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080364>
 11. Bianco, A., & Uccella, N. (2000). *Biophenolic components of olives*.
www.elsevier.com/locate/foodres
 12. Boukhenouna, S., Wilson, M. A., Bahmed, K., & Kosmider, B. (2018). Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2018/5730395>
 13. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 14. Bukowska, B., Michalowicz, J., Pieniazek, D., Sicinska, P., & Duda, W. (2006). Superoxide Dismutases and Their Inhibitors-the Role in Some Diseases. *Current Enzyme Inhibition*, 2(4), 379–397.
<https://doi.org/10.2174/157340806778699271>
 15. Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., & Castegna, A. (2001). PII: S1471-4914(01)02173-6. In *TRENDS in Molecular Medicine* (Vol. 7, Issue 12).
<http://tmm.trends.com1471>
 16. Charitou, P., & Burgering, B. M. T. (2013). Forkhead box(O) in control of reactive oxygen species and genomic stability to ensure healthy lifespan. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 19, Issue 12, pp. 1400–1419).
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4921>
 17. Chartzoulakis, K., Patakas, A., & Bosabalidis, A. M. (1999). Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 42).
www.elsevier.com/locate/envexpbot
 18. Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Fidalgo, A., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2016). Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. In *European Journal of Lipid Science and Technology* (Vol. 118, Issue 4, pp. 503–511). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500036>
 19. Clark, L. F., & Kerr, W. A. (2017). Climate change and terroir: The challenge of adapting geographical indications. *Journal of World Intellectual Property*, 20(3–4), 88–102. <https://doi.org/10.1111/jwip.12078>

20. Dainton, F. S. (1967). *THE SIMPLEST FREE RADICALS*.
21. Damak, F., Bougi, M. S. M., Araoka, D., Baba, K., Furuya, M., Ksibi, M., & Tamura, K. (2021). Soil geochemistry, edaphic and climatic characteristics as components of Tunisian olive terroirs: Relationship with the multielemental composition of olive oils for their geographical traceability. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s41207-021-00241-y>
22. Denaxa, N. K., Damvakaris, T., & Roussos, P. A. (2020). Antioxidant defense system in young olive plants against drought stress and mitigation of adverse effects through external application of alleviating products. *Scientia Horticulturae*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108812>
23. di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
24. Evangelou, E., Kiritsakis, K., Sakellaropoulos, N., & Kiritsakis, A. (2018). Table olives production, postharvest processing, and nutritional qualities. In *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing: Second Edition* (Vols. 2–2, pp. 727–744). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119098935.ch31>
25. Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
26. Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Statiri, A., Tsioutsouliti, A., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, 33(11), 1099–1112. <https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
27. Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A. ... Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12, 5846–5856. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
28. Günes-Bayir, A., Kiziltan, H. S., Kocyigit, A., Güler, E. M., Karataş, E., & Toprak, A. (2017). Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 28(5), 522–530. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000491>

29. Gutowski, M., & Kowalczyk, S. (2013). *A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance*. www.actabp.pl
30. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th Edition, Oxford University Press, New York.
31. Hegeman, A.D., & Frey, P.A. (2007). *Enzymatic Reaction Mechanisms*.
32. Henkel, R. (2010). ROS and DNA integrity—implications of male accessory gland infections. In *Clinical Andrology* (pp. 324–328). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781841847474-37>
33. Horn, T., Bettray, W., Slusarenko, A. J., & Gruhlke, M. C. H. (2018). S-allylmercaptogluthathione is a substrate for glutathione reductase (E.c. 1.8.1.7) from yeast (*saccharomyces cerevisiae*). *Antioxidants*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/antiox7070086>
34. Kafkaletou, M., Ouzounidou, G., & Tsantili, E. (2021). *Fruit Ripening, Antioxidants and Oil Composition in Koroneiki Olives (Olea europea L.) at Different Maturity Indices*. <https://doi.org/10.3390/agronomy>
35. Katsoulis, E. N. (2016). The olive leaf extract oleuropein exerts protective effects against oxidant-induced cell death, concurrently displaying pro-oxidant activity in human hepatocarcinoma cells. *Redox Report*, 21(2), 90–97. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000039>
36. Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 28(2), 141–143. <https://doi.org/10.1017/S0317167100052823>
37. Kerasioti, E., Veskoukis, A. S., Skaperda, Z., Zacharias, A., Poulas, K., Lazopoulos, G., & Kouretas, D. (2020). The flavoring and not the nicotine content is a decisive factor for the effects of refill liquids of electronic cigarette on the redox status of endothelial cells. *Toxicology Reports*, 7, 1095–1102. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.029>
38. Kouka, P., Tekos, F., Papoutsaki, Z., Stathopoulos, P., Halabalaki, M., Tsantarliotou, M., Zervos, I., Nepka, C., Liesivuori, J., Rakitskii, V. N., Tsatsakis, A., Veskoukis, A. S., & Kouretas, D. (2020). Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicology Reports*, 7, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.007>
39. Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, J. S., Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, W. J., Greenberg, R., Litt, T., Mercuri, A. M., Miebach, A., Roberts, C. N., Woldring, H., & Woodbridge, J. (2019). The origin and spread of olive

- cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. *Holocene*, 29(5), 902–922. <https://doi.org/10.1177/0959683619826654>
40. Lecci, R. M., D'antuono, I., Cardinali, A., Garbetta, A., Linsalata, V., Logrieco, A. F., & Leone, A. (2021). Antioxidant and pro-oxidant capacities as mechanisms of photoprotection of olive polyphenols on uva-damaged human keratinocytes. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082153>
 41. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 11, pp. 26087–26124). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
 42. Ligor, M., Olszowy, P., & Buszewski, B. (2012). Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(7), 2233–2248. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5451-z>
 43. Liu, D., Yun, Y., Yang, D., Hu, X., Dong, X., Zhang, N., Zhang, L., Yin, H., & Duan, W. (2019). What is the biological function of uric acid? An antioxidant for neural protection or a biomarker for cell death. *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4081962>
 44. Liu, K., Qin, Y. H., Yu, J. Y., Ma, H., & Song, X. L. (2016). 3-rythrodinol isolated from *Conyza canadensis* inhibits MKN-45 human gastric cancer cell proliferation by inducing apoptosis, cell cycle arrest, DNA fragmentation, ROS generation and reduces tumor weight and volume in mouse xenograft model. *Oncology Reports*, 35(4), 2328–2338. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4610>
 45. Loumou, A., & Giourga, C. (2003). Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean.” In *Agriculture and Human Values* (Vol. 20).
 46. Mattson, M. P. (2008). Dietary factors, hormesis and health. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 7, Issue 1, pp. 43–48). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.004>
 47. Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., & Hagidimitriou, M. (2016). Total Phenolic content and antioxidant activity of leaves and drupes in major Greek olive varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 155–161. <https://doi.org/10.15835/nbha44110381>
 48. Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., & Hagidimitriou, M. (2016). Phenolic Profile of leaves and drupes in major Greek olive varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 162–166. <https://doi.org/10.15835/nbha44110382>

49. Miwa, T., Kanda, M., Umeda, S., Tanaka, H., Shimizu, D., Tanaka, C., Kobayashi, D., Hayashi, M., Yamada, S., Nakayama, G., Koike, M., & Kodera, Y. (2019). Establishment of peritoneal and hepatic metastasis mouse xenograft models using gastric cancer cell lines. *In Vivo*, 33(6), 1785–1792. <https://doi.org/10.21873/invivo.11669>
50. Monteleone, Erminio. (2013). *Olive Oil Sensory Science*. Wiley-Blackwell.
51. Mougou, N., Baalbaki, B., Doupis, G., Kavroulakis, N., Poullos, S., Vlachonassios, K. E., & Koubouris, G. C. (2020). The effect of low temperature on physiological, biochemical and flowering functions of olive tree in relation to genotype. *Sustainability (Switzerland)*, 12(23), 1–14. <https://doi.org/10.3390/su122310065>
52. Mougou, N., Trika, F., Trantas, E., Ververidis, F., Makris, A., Argiriou, A., & Vlachonassios, K. E. (2018). Expression of hydroxytyrosol and oleuropein biosynthetic genes are correlated with metabolite accumulation during fruit development in olive, *Olea europaea*, cv. Koroneiki. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.004>
53. Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 73, pp. 26–33). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.011>
54. Ozturk, A. (2014). Understanding the Characteristics of Oleuropein for Table Olive Processing. *Journal of Food Processing & Technology*, 05(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000328>
55. Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Alam, M. K., & Corsetti, A. (2020). Table olives more than a fermented food. In *Foods* (Vol. 9, Issue 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods9020178>
56. Rellini, I., Demasi, M., Scopesi, C., Ghislandi, S., Salvidio, S., Pini, S., & Stagno, A. (2022). 24 EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL COMPONENTS OF THE TAGGIASCA “TERROIR” OLIVE (IMPERIA, ITALY).
57. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 11, pp. 1603–1616). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
58. Revelou, P. K., Xagoraris, M., Alexandropoulou, A., Kanakis, C. D., Papadopoulos, G. K., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). Chemometric

- study of fatty acid composition of virgin olive oil from four widespread greek cultivars. *Molecules*, 26(14). <https://doi.org/10.3390/molecules26144151>
59. Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: A review. In *Journal of Nutritional Science*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>
 60. Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., & Garrido, A. (2004). Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 479–484. <https://doi.org/10.1021/jf030525l>
 61. Rugini, E., Baldoni, L., & Muleo, R. (2016). *Compendium of Plant Genomes The Olive Tree Genome*. <http://www.springer.com/series/11805>
 62. Russo, G., Beritognolo, I., Bufacchi, M., Stanzione, V., Pisanelli, A., Cioffi, M., Lauteri, M., & Brush, S. B. (2020). Advances in biocultural geography of olive tree (*Olea europaea* L.) landscapes by merging biological and historical assays. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64063-8>
 63. Samhan-Arias, A. K., & Gutierrez-Merino, C. (2014). Purified NADH-cytochrome b5 reductase is a novel superoxide anion source inhibited by apocynin: Sensitivity to nitric oxide and peroxynitrite. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.033>
 64. Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(6–7), 608–619. <https://doi.org/10.1080/15257770802138558>
 65. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, 48(17), 4827–4833.
 66. Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K., & Paudyal, B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-23>
 67. Shamshoum, H., Vlatcheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. In *BioFactors* (Vol. 43, Issue 4, pp. 517–528). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>
 68. Skaperda, Z., Kyriazis, I., Vardakas, P., Tekos, F., Antoniou, K., Giannakeas, N., & Kouretas, D. (2021). In vitro antioxidant properties of herb decoction

- extracts derived from Epirus, Greece . *International Journal of Functional Nutrition*, 2(5). <https://doi.org/10.3892/ijfn.2021.21>
69. Skaperda, Z., Tekos, F., Makri, S., Angelakis, C., Vassi, E., Vardakas, P., Patouna, A., Terizi, K., Kyriazi, D., & Kouretas, D. (2021). A novel combined bioactivity / chemoactivity holistic approach for the evaluation of dietary supplements. *Food and Chemical Toxicology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112159>
 70. Stefanoudaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K., & Harwood, J. (2009). Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7048–7055. <https://doi.org/10.1021/jf900862w>
 71. Sun, L., Luo, C., & Liu, J. (2014). Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. *Food and Function*, 5(8), 1909–1914. <https://doi.org/10.1039/c4fo00187g>
 72. Sun, W., Zhang, N.-D., Zhang, T., Li, Y.-N., Xue, H., Cao, J.-L., Hou, W.-S., Liu, J., Wang, Y., & Jin, C.-H. (2023). Cyanidin-3-O-Glucoside Induces the Apoptosis of Human Gastric Cancer MKN-45 Cells through ROS-Mediated Signaling Pathways. *Molecules*, 28(2), 652. <https://doi.org/10.3390/molecules28020652>
 73. Tang, S. Y., & Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 394, Issue 1, pp. 1–5). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.137>
 74. Theodosi, S., Kosma, I. S., & Badeka, A. v. (2021). Quality characteristics of Koroneiki olive oil from Zakynthos island (Greece) and differentiation depending on the altitude level. *European Food Research and Technology*, 247(5), 1235–1248. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03705-1>
 75. Toric, J., Markovic, A. K., Brala, C. J., & Barbaric, M. (2019). Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 69(4), 461–482. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0052>
 76. Torres, M., Pierantozzi, P., Searles, P., Cecilia Rousseaux, M., García-Inza, G., Miserere, A., Bodoira, R., Contreras, C., & Maestri, D. (2017). Olive cultivation in the southern hemisphere: Flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01830>

77. Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 164, Issue 3, pp. 341–346). <https://doi.org/10.1083/jcb.200311055>
78. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 160, Issue 1, pp. 1–40). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
79. Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., & Fieschi, F. (2021). NADPH oxidases (Nox): An overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxidants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
80. Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., & Espínola, F. (2019). Characterization of Olive Oils from Superintensive Crops with Different Ripening Degree, Irrigation Management, and Cultivar: (Arbequina, Koroneiki, and Arbosana). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800360>
81. Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>
82. Visioli, F., Poli, A., & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 22, Issue 1, pp. 65–75). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/med.1028>
83. Wadhwa, N., Mathew, B. B., Jatawa, S. K., & Tiwari, A. (2012). *Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance*.
84. Watts, L. T., Lloyd, R., Garling, R. J., & Duong, T. (2013). Stroke neuroprotection: Targeting mitochondria. In *Brain Sciences* (Vol. 3, Issue 2, pp. 540–560). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci3020540>
85. Yan, C.-M., Chai, E.-Q., Cai, H.-Y., Miao, G.-Y., and Ma, W. (2015). Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Mol. Med. Rep.* 11, 4617–4624. Jun
86. Zahra, K. F., Lefter, R., Ali, A., Abdellah, E. C., Trus, C., Ciobica, A., & Timofte, D. (2021). The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. In *Oxidative*

Medicine and Cellular Longevity (Vol. 2021). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2021/9965916>

87. Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2016). Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>