



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**
UNIVERSITY
OF THESSALY

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

**«Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραπροϊόντος ελαιουργίας
σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (HepG2) in vitro σε cell-free και cell-
based συστήματα»**

Bachelor Thesis

**«Assessment of the antioxidant activity of olive mill waste by-
product in human liver cells (HepG2) in vitro using cell-free and cell-
based systems»**

Κατσαραμενίδου Χρυσή-Σταυρούλα

Προπτυχιακή φοιτήτρια

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2025

**« Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραπροϊόντος ελαιουργίας
σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (HepG2) in vitro σε cell-free και cell-
based συστήματα»**

Επιβλέπων Καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

**«Assessment of the antioxidant activity of olive mill waste by-
product in human liver cells (HepG2) in vitro using cell-free and cell-
based systems»**

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios
Laboratory of Animal Physiology

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Βεσκούκης Αριστείδης: Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Τμήμα Διαιτολογίας & Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιαννούλη Περσεφόνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η διεξαγωγή και διεκπεραίωση των πειραμάτων έλαβε χώρα στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και Επιβλέπων της πτυχιακής μου εργασίας κ. Κουρέτα Δημήτριο, τόσο για την ανάθεση του θέματος, όσο και για την συμβουλευτική και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθώς και τους κ. Βεσκούκη Αριστείδη και κ. Γιαννούλη Περσεφόνη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου και κυρίως την υποψήφια διδάκτορα Γκασδρόγκα Μαρία για το χρόνο που αφιέρωσε, την υπομονετική καθοδήγηση και την προθυμία που επέδειξε, προς επίλυση τυχόν αποριών μου, καθώς και τους συμφοιτητές μου για τη συνεργασία, τη βοήθεια και το φιλικό κλίμα που εξασφάλισαν.

Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την αμέριστη στήριξη, ενθάρρυνση και υπομονή καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Σήμερα οι αυξητικές τάσεις που παρουσιάζει η κατανάλωση ελιάς και ελαιόλαδου οδηγούν σε υπερβολική αύξηση της ποσότητας των παραπροϊόντων που παράγονται από τα ελαιοτριβεία. Τα οφέλη της ελιάς για την ανθρώπινη υγεία, παρόλο που ποικίλλουν και αποδίδονται στην πολυφαινολική σύσταση του φυτού, έρχονται σε άμεση αντιδιαστολή με το περιβαλλοντικό αντίκτυπο της απόρριψης των παραπροϊόντων στα οικοσυστήματα. Η ανάγκη για ανάλυση του αντιοξειδωτικού και κυτταροπροστατευτικού τους προφίλ κρίνεται έτσι μείζονος σημασίας ως προς την επακόλουθη αξιοποίηση τους. Προς αυτή την κατεύθυνση, και για την κάλυψη ανάλογων αναγκών, η παρούσα μελέτη επιχειρεί αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραπροϊόντος ελαιουργίας στερεής φάσης, με τη χρήση *in vitro* τεχνικών σε cell-free και cell-based συστήματα. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ισχυρή αντιοξειδωτική (DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-}, ORAC), αναγωγική (Reducing power, CUPRAC) και αντιγενοτοξική (Plasmid relaxation assay) δράση του εξεταζόμενου δείγματος, και συγκεκριμένα υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ανιόντος σουπεροξειδίου (IC₅₀: 0.019 mg/ml), καθώς και υψηλή ικανότητα αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου (AU_{0.5}: 0.07 mg/ml). Επιπλέον, το δείγμα παρουσιάζει υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο (Folin-Ciocalteu TPC: 16.9 mg GAE/ g). Τέλος, η προσθήκη σε ηπατικά κύτταρα δείχνει μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης σε συνδυασμό με μειωμένα επίπεδα ελευθέρων ριζών και αυξημένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων μέσω εξάντλησης της γλουταθειόνης. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τελικώς την υψηλή προστιθέμενη αξία τέτοιων παραπροϊόντων με δυνατότητα χρήσης σε τομείς παραγωγής τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Λέξεις κλειδιά: Ελιά, παραπροϊόν ελαιουργίας, πολυφαινόλες, αντιοξειδωτική δράση, αντιγενοτοξική δράση, ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2

Abstract

Nowadays, the increasing trends of olive and olive oil consumption are leading to an uncontrolled rise in the quantity of by-products generated by olive mills. The health benefits of olives for humans, although vary and are attributed to the plant's polyphenolic composition, stand in stark contrast to the environmental impact arising from the disposal of waste into ecosystems. Therefore, analyzing their antioxidant and cytoprotective profile is of paramount importance for their subsequent utilization. To this end, and to address related needs, the present study undertakes an evaluation of the antioxidant activity of a solid-phase olive mill by-product using in vitro techniques in both cell-free and cell-based systems. The results reveal strong antioxidant (DPPH[·], ABTS^{·+}, O₂^{·-}, ORAC), reducing (Reducing power, CUPRAC), and antigenotoxic capacity (plasmid relaxation assay), with the greatest antioxidant capacity being found in the O₂^{·-} assay (IC₅₀: 0.019 mg/ml) as well as high reducing capacity towards Fe³⁺ (AU_{0.5}: 0.07 mg/ml). Furthermore, the sample exhibits high phenolic content (Folin-Ciocalteu TPC: 16.9 mg GAE/ g). The cell-based results reveal a reduction of glutathione and free radical levels, as well as an increase in the lipid peroxidation levels of human hepatocellular carcinoma cells, thus demonstrating the potential induction of the cell antioxidant defenses by depleting the GSH levels. In conclusion, these findings ultimately confirm the high added value of such by-products, with potential applications in food, pharmaceutical, and cosmetic production sectors.

Keywords: Olive, olive by-product, polyphenols, antioxidant activity, antigenotoxic activity, human liver cancer cells HepG2

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	v
Abstract	vi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	x
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ελιά (<i>Olea europaea</i> L.)	1
1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση	1
1.1.2 Συνθήκες ανάπτυξης	2
1.1.3 Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα	3
1.1.4 Οικονομία ελιάς: Στοιχεία, τάσεις και προκλήσεις	4
1.1.5 Παραπροϊόντα ελιάς	5
1.1.6 Προοπτικές βιώσιμης διαχείρισης παραπροϊόντων ελιάς	8
1.2 Ελεύθερες ρίζες	10
1.2.1 Κατηγοριοποίηση ελευθέρων ριζών	11
1.2.2 Ιδιότητες ορισμένων ελευθέρων ριζών	12
1.2.3 Προέλευση και πορεία δημιουργίας ελευθέρων ριζών	13
1.2.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	16
1.3 Οξειδωτικό στρες	18
1.3.1 Συστήματα ταξινόμησης οξειδωτικού στρες	19
1.3.2 Οξειδωτικό στρες και παθογένεια	22
1.3.3 Προσαρμοστική απόκριση στο οξειδωτικό στρες	24
1.4 Αντιοξειδωτικά	25
1.4.1 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών	25
1.4.2 Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών	28
1.4.3 Συνήθη αντιοξειδωτικά	30
1.5 Πολυφαινόλες	33
1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών	34
1.5.2 Πολυφαινόλες στερεών παραπροϊόντων ελιάς	35
1.5.3 Βιοδιαθεσιμότητα βιοφαινολικών ενώσεων	36
1.5.4 Θετικές επιδράσεις πολυφαινολών	37
1.5.5 Δυσνητικά αρνητικές επιπτώσεις φαινολών	38
2. ΣΚΟΠΟΣ	39
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40

3.1 Εισαγωγή	40
3.2 Εξεταζόμενο δείγμα	40
3.3 Χημικά αντιδραστήρια.....	40
3.4 In vitro τεχνικές (cell-free assays).....	41
3.4.1 Προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu.....	41
3.4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH·	42
3.4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS·+	43
3.4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να ανάγει τον τρισθενή σε δισθενή σίδηρο (Reducing Power).....	44
3.4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να ανάγει τον δισθενή σε μονοσθενή χαλκό (CUPRAC)	45
3.4.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ · ⁻ (Superoxide).....	46
3.4.7 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να καθυστερεί την οξείδωση της φλουορεσκεΐνης (ORAC)	47
3.4.8 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO·) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	49
3.5 Κυτταροκαλλιέργειες (cell-based assays)	50
3.5.1 Κυτταρική σειρά HepG2.....	50
3.5.2 Συνθήκες καλλιέργειας	51
3.5.3 Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο XTT	51
3.5.4 Κυτταρομετρία ροής	53
3.5.4.1 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων της GSH.....	55
3.5.4.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων των ROS	55
3.5.5 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω αντιδραστηρίου Bradford.....	56
3.5.6 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS).....	57
3.6 Στατιστική ανάλυση	58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
4.1 Cell-free assays.....	59
4.2 Cell-based assays	59
4.2.1 Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο XTT	59

4.2.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων της GSH	60
4.2.3 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων των ROS	61
4.2.4 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)	62
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
5.1 Cell-free assays	63
5.2 Cell-based assays	65
5.3 Γενικά συμπεράσματα, μελλοντικά βήματα και προοπτικές	67
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	79

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BOS: basal oxidative stress

HPLC-MS: high performance liquid chromatography-mass spectrometry

LOS: low intensity oxidative stress

MAE: microwave-assisted extraction

MF: microfiltration

NF: nanofiltration

NfκB: nuclear factor κ-B

NOE: no observable effect point

Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

OMWW: olive mill wastewater

PLE: pressurized liquid extraction

RCS: reactive carbonyl species

RNS: reactive nitrogen species

RO: reverse osmosis

ROS: reactive oxygen species

RSS: reactive sulfur species

SFE: supercritical fluid extraction

SOS: strong oxidative stress

UAE: ultrasound-assisted extraction

UF: ultrafiltration

VOS: very strong oxidative stress

ZEP: zero equivalent point

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελιά (*Olea europaea* L.)

Η ελιά (*Olea europaea* L.) ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, με το γένος *Olea* να περιλαμβάνει 3 επιμέρους υπογένη. Είναι δέντρο μικρό και αειθαλές με ξυλώδη κορμό που συνήθως έχει ελικοειδή διαμόρφωση. Σε πλήρη ανάπτυξη μπορεί να φτάσει σε ύψος από 8 έως 15 μέτρα. Τα φύλλα της ελιάς έχουν στρογγυλεμένη βάση, μήκος γύρω στα 4-10 εκατοστά, πλάτος γύρω στα 1-3 εκατοστά, σταχτό-πράσινο χρώμα και αναπτύσσονται εναλλάξ στους νέους βλαστούς. Τα άνθη της από την άλλη, είναι λευκά και δερματώδη με μήκος περίπου 1-2 εκατοστά. Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη με πυρήνα στο κέντρο και αποτελείται από τρία επιμέρους μέρη: την εξωτερική φλούδα (εξωκάρπιο), το σαρκώδες εσωτερικό μέρος (μεσοκάρπιο) και το σκληρό περίβλημα του σπόρου (ενδοκάρπιο). Οι καρποί έχουν σχήμα σφαιρικό με διάμετρο 2-3 εκατοστά, και όταν είναι ώριμοι έχουν πράσινο αλλά και μωβ χρώμα. Η μορφή και τα χαρακτηριστικά τόσο του δέντρου όσο και του ελαιόκαρπου εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία και το γενετικό υπόβαθρο (γονότυπο) (Hussain et al., 2021).

1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση

Η ελιά, που είναι γνωστή και ως «δέντρο της αιωνιότητας», αποτελεί μία από τις αρχαιότερες καλλιέργειες καρποφόρων δέντρων, με προέλευση από την ασιατική ήπειρο. Η ιστορία της καταγράφεται εδώ και 6.000-8.000 χρόνια (Hussain et al., 2021), με το φυτό να απαντάται σε δύο μορφές, είτε ως αγριελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) είτε ως καλλιεργήσιμη ελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) (Bracci et al., 2011). Παρόλο που η καταγωγή του ελαιόδεντρου δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί, αποτελεί κοινή πεποίθηση ότι η άγρια μορφή είναι ο πρόγονος της ελιάς που καλλιεργείται μέχρι και σήμερα (Bombarely et al., 2021). Το κέντρο εξημέρωσης της ελιάς θεωρείται ότι βρίσκεται στην ανατολική λεκάνη της Μεσογείου με μερικά δευτερεύοντα σημεία εξημέρωσης να εξαπλώνονται στην υπόλοιπη περιοχή (Besnard et al., 2013). Αρχαιολογικά και γενετικά ευρήματα αποδεικνύουν ότι η εξημέρωση της καλλιεργούμενης ελιάς συνέβη μετά την εμφάνιση σημαντικών ανθρώπινων πολιτισμών στη Μέση Ανατολή πριν από περίπου 6.000 χρόνια, κατά τη Νεολιθική εποχή. Η μεγάλη διάρκεια ζωής και ο αγενής

πολλαπλασιασμός της ελιάς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενετική ποικιλότητα των καλλιεργούμενων μορφών της (Sales et al., 2021). Από την ανατολική Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή η ελιά ταξίδεψε αρχικά στην Κρήτη και τη νότιο Ελλάδα. Οι Έλληνες υπήρξαν ο πρώτος λαός που καλλιεργήσε την ελιά σε ευρωπαϊκό-μεσογειακό χώρο από τα Μινωικά και Μυκηναϊκά χρόνια. Έποικοι της χώρας είτε Φοίνικες έμποροι πιθανολογείται πως συνέβαλαν στην εξάπλωση της. Ακολούθως, η ελιά επεκτάθηκε στην ηπειρωτική Ελλάδα, την Αίγυπτο, την Ιταλία και την Ιβηρική Χερσόνησο, αποκτώντας τεράστια οικονομική και συμβολική αξία. Αργότερα, έφτασε και σε άλλες ηπείρους, όπως η Αφρική, η Αυστραλία και η Αμερική διατηρώντας ωστόσο το συμβολικό χαρακτήρα και το προφίλ καρπού άρρηκτα συνδεδεμένου με τον μεσογειακό πολιτισμό (Βλαχάκης, 2005). Στις μέρες μας η καλλιέργεια της ελιάς δοκιμάζεται πέρα από τα φυσικά της όρια, με τη γεωγραφική εξάπλωση του ελαιόδεντρου να καταδεικνύει μια τάση παγκοσμιοποίησης της καλλιέργειας, η οποία περικλείει πλέον ευρύ φάσμα γεωγραφικών και κλιματικών συνθηκών.

1.1.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Το ελαιόδεντρο είναι είδος που παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στην ξηρασία, στην αλατότητα και στις χαμηλές θερμοκρασίες που αγγίζουν έως και τους -8°C , ειδικά σε σύγκριση και με οπωροφόρα δέντρα που γενικά είναι ευαίσθητα σε αυτές τις συνθήκες. Αναπτύσσεται κυρίως σε εύκρατες και υποτροπικές περιοχές, υψομέτρου μέχρι και τα 2.850μ. (Hussain et al., 2021), με τη ζώνη καλλιέργειάς της να εκτείνεται μεταξύ 30° και 45° . Το γένος *Olea* δεν είναι απαιτητικό ως προς το έδαφος καθώς ευδοκimeί ακόμα και σε φτωχά, χαλκώδη και ασβεστώδη εδάφη. Τα καλά στραγγιζόμενα, γόνιμα, βαθιά και ελαφρώς αλκαλικά ($\text{pH}=6.5-7.5$) εδάφη ωστόσο κρίνονται ιδανικά καθώς αυξάνουν σημαντικά την απόδοση και την ποιότητα του παραγόμενου ελαιόκαρπου. Η ελιά προτιμά για την ανάπτυξή της ήπιο και βροχερό χειμώνα και ζεστό και ξηρό καλοκαίρι (Βασιλακάκης, 2016), με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της κυμαίνεται από 15 έως 20°C και τις βροχοπτώσεις να υπερβαίνουν τα 450 χιλιοστά βροχής ανά έτος (Hussain et al., 2021). Η παντελής έλλειψη υγρασίας κατά την κρίσιμη περίοδο σχηματισμού των ανθοταξιών έως και την καρπόδεση μπορεί να επιδράσει αρνητικά και να συντελέσει στην ακαρπία του φυτού. Γι' αυτό, συνίσταται τόσο η τακτική άρδευση, όσο το φρεζάρισμα, η συγκαλλιέργεια

με χορτοδοτικά φυτά και η λίπανση, κυρίως αζωτούχος, προκειμένου να εξασφαλισθεί ο εμπλουτισμός του εδάφους με οργανική ύλη, η απαλλαγή από εχθρούς και γενικά η ταχεία ανάπτυξη του ελαιόδεντρου (Ζαρμπούτης & Γκακνή, 2009).

1.1.3 Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα

Στον Ελλαδικό χώρο παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία σε ποικιλίες ελιάς, τόσο για ελαιοπαραγωγή όσο και για επιτραπέζια κατανάλωση. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περισσότερες από πενήντα ποικιλίες, με ορισμένες να κυριαρχούν σε συγκεκριμένες περιοχές λόγω εδαφικών, κλιματικών, παραδοσιακών παραγόντων και καταναλωτικών προτιμήσεων (Bracci et al., 2011). Μορφολογικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των ποικιλιών του φυτού αφορούν στην εμφάνιση του δέντρου (μέγεθος, πλαγιόκλαδο, ορθόκλαδο κ.α.), στα φύλλα (σχήμα, χρώμα, διαστάσεις), στους καρπούς, στους πυρήνες, στο χρόνο ωρίμανσης και στην παραγωγικότητα. Βάσει μεγέθους του καρπού επομένως οι ελιές διακρίνονται σε:

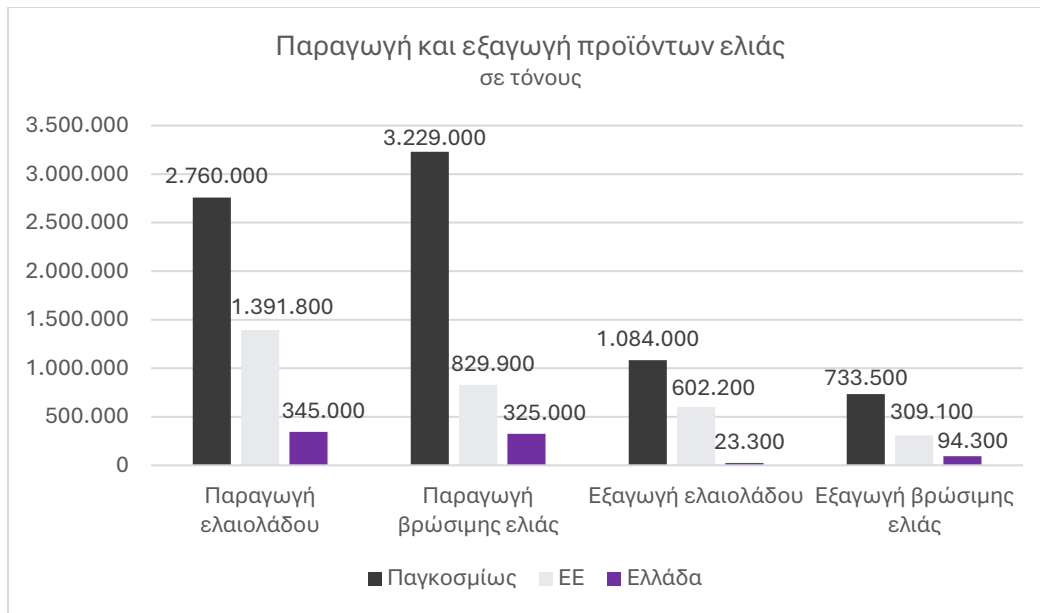
- Μικρόκαρπες
- Μεσόκαρπες
- Μεγαλόκαρπες/ αδρόκαρπες

Η μικρόκαρπη κατηγορία ελιάς αποτελείται από καρπούς που προορίζονται συνήθως για παραγωγή ελαιόλαδου και περιλαμβάνει ποικιλίες όπως η Αγριελιά, η Κορωνέικη, η Κουτσουρελιά, η Λιανολιά Κέρκυρας και η Μαστοειδής. Οι μεσόκαρποι καρποί είναι συνήθως διπλής χρήσης, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για παραγωγή ελαιόλαδου όσο και για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, με σημαντικές ποικιλίες τη Βανανολιά, την Αγουρομανακολιά, την Αδραμυτινή, τη Θρουμπολιά και τη Μεγαρίτικη. Τέλος, οι αδρόκαρπες ελιές χρησιμοποιούνται κυρίως ως βρώσιμες, γνωστές και ως επιτραπέζιες. Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται η Κονσερβολιά, η Χονδρολιά Χαλκιδικής, η Καρυδολιά, και οι ποικιλίες Καλαμών, Αμυγδαλολιά και Γαϊδουρελιά, οι οποίες και διακρίνονται για το μεγάλο μέγεθός τους και τη μεγάλη αναλογία σάρκας-πυρήνα (Αλεξάκης, 1998). Από τις παραπάνω η Κορωνέικη, η Μαστοειδής και η Θρουμπολιά είναι οι κυριότερες ποικιλίες (Aksehirli-Pakyurek et al., 2017) που την

περίοδο 2013-2018 κατέγραψαν μέση παραγωγή 530.000 τόνων ελαιόκαρπου (Markakis et al., 2021).

1.1.4 Οικονομία ελιάς: Στοιχεία, τάσεις και προκλήσεις

Η καλλιέργεια ελιάς αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία της οικονομίας των μεσογειακών χωρών, τόσο σε επίπεδο παραγωγής ελαιόλαδου και επιτραπέζιας ελιάς, όσο και εξαγωγών. Στην Ελλάδα, πάνω από 11 εκατομμύρια στρέμματα χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια ελιάς, έκταση που καλύπτει το 20% περίπου της συνολικής καλλιεργούμενης γης, με το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής να συγκεντρώνεται στην Πελοπόννησο, την Κρήτη, τη Μυτιλήνη και τα νησιά του Ιονίου (ΕΛΣΤΑΤ, Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων). Η χώρα μας κατέχει τη 2^η θέση παγκοσμίως στην παραγωγή ελαιόλαδου και την 3^η θέση στην παραγωγή βρώσιμων ελιών. Επιπλέον, ανήκει στις πρώτες χώρες κατανάλωσης και εξαγωγής προϊόντων που προέρχονται από την επεξεργασία ελιάς, με το 98% των εξαγωγών ελαιόλαδου να προορίζεται για χώρες της Ε.Ε. Αν και τα περισσότερα ελαιοτριβεία στην Ελλάδα είναι μικρότερα και λιγότερο τεχνολογικά προηγμένα από αυτά στην Ισπανία και την Ιταλία, εξασφαλίζουν τέτοιες συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας του καρπού που καθιστούν το ελληνικό ελαιόλαδο ως προϊόν χαμηλής οξύτητας. Η ελληνική παραγωγή ελαιόλαδου επικεντρώνεται έτσι στην παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας, με περίπου το 72% των εξαγωγών να αποτελείται από έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) (IOC, International Olive Council). Ωστόσο, παρά την ανώτερη ποιότητα, απαιτούνται σχέδια επενδύσεων σε τυποποίηση και εξαγωγές, με στόχο τη μεγιστοποίηση της προστιθέμενης αξίας, την ανάδειξη του ελληνικού ελαιόλαδου και την ενίσχυση των εσόδων της ελληνικής οικονομίας (Εθνική Τράπεζα Ελλάδος, 2015). Είναι λοιπόν σαφές ότι η καλλιέργεια ελιάς είναι σημαντικός γεωργικός πυλώνας για τον τομέα εξαγωγών στην Ελλάδα και μόνο με την κατάλληλη ενίσχυση της τυποποίησης και της εξωστρέφειας του ελαιοκομικού κλάδου μπορεί να συμβάλει στην οικονομική ενίσχυση της χώρας.



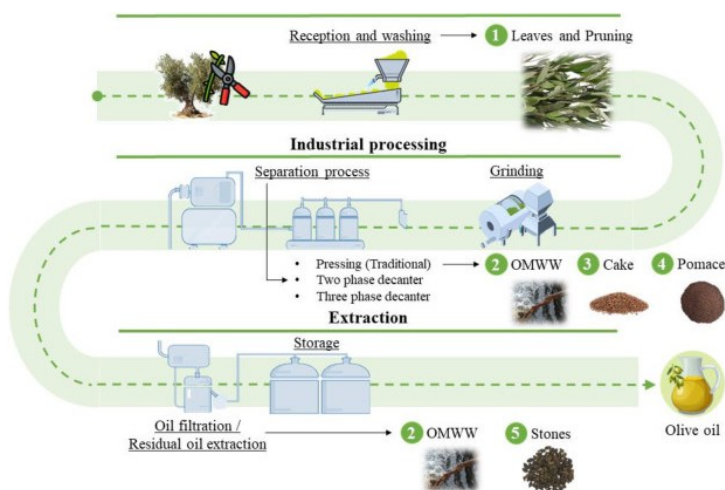
Εικόνα 1: Παραγωγή και κατανάλωση ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελιών παγκοσμίως, στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στην Ελλάδα την περίοδο 2022/2023 (IOC, International Olive Council)

1.1.5 Παραπροϊόντα ελιάς

Η πορεία παραγωγής του ελαίου οδηγεί στο σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων παραπροϊόντων που αποτελούν πρόκληση τόσο για την οικονομία όσο και για το περιβάλλον. Η παραγωγή ελαιόλαδου γίνεται μέσω μηχανικών μέσων και ανάλογα με τη μέθοδο που επιλέγεται, διακρίνεται σε παραγωγή με τη χρήση παραδοσιακής πρέσας, παραγωγή βασιζόμενη σε διφασική φυγοκέντρωση και παραγωγή βασιζόμενη σε τριφασική φυγοκέντρωση. Η διεργασία ξεκινά με τη μηχανική απομάκρυνση των προσμείξεων (συμπιεσμένος αέρας/ δονούμενες σίτες) και το πλύσιμο του ελαιοκαρπού. Κατόπιν, οι ελιές συνθλίβονται (παρουσία του πυρήνα) έως ότου διαμορφωθεί η ελαιοζύμη, που είναι μια πάστα αποτελούμενη από λάδι, νερό και στερεά. Έπειτα, η ελαιοζύμη ομογενοποιείται μέσω μάλαξης από περιστρεφόμενους αναδευτήρες μέχρι να γίνει πιο συνεκτική και τελικά οδηγείται σε μηχανήματα παραλαβής ελαιόλαδου. Από τη μέθοδο διαχωρισμού που χρησιμοποιείται προκύπτουν διάφοροι τύποι παραπροϊόντων. Η παραδοσιακή διαδικασία πίεσης διαχωρίζει σταδιακά το μείγμα στερεής και υγρής φάσης με τη θερμική καταπόνηση του καρπού να χαρακτηρίζεται μικρή. Στο σύστημα δύο φάσεων, χρησιμοποιείται νερό μόνο για την πλύση του καρπού και η φυγοκέντρωση διαχωρίζει το λάδι από την ημιστερεή φάση, η οποία κατεργάζεται περαιτέρω με αποξήρανση ή

εκχύλιση για ανάκτηση επιπλέον ποσότητας ελαίου. Στο σύστημα τριών φάσεων, απαιτούνται μεγάλες εισροές ενέργειας και νερού για το διαχωρισμό, αυξάνοντας τελικά περισσότερο τα ποσά υγρών αποβλήτων. Σε κάθε περίπτωση, το διαχωρισμό ακολουθεί η διήθηση και αποθήκευση του τελικού προϊόντος.

Τα παραπροϊόντα από τη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2, διακρίνονται σε: (1) φύλλα και βιομάζα από το κλάδεμα, (2) υγρά απόβλητα ελαιотριβείων (*olive mill wastewater, OMWW*) γνωστά και ως κασίγαρος, (3,4,5) στερεά κατάλοιπα όπως η ελαιοπυρήνα (διφασική/ τριφασική) και το ελαιοπυρηνόξυλο (ξηρή πυρήνα). Η παραγωγή αυτών είναι αναπόφευκτη λόγω φύσης της επεξεργασίας και αυξανόμενης ζήτησης για ελαιόλαδο. Ωστόσο ο διττός τους ρόλος καθιστά τη διαχείρισή τους ιδιαίτερα κρίσιμη.



Εικόνα 2: Παραπροϊόντα που προκύπτουν από την επεξεργασία ελιάς προς παραγωγή ελαιόλαδου (Otero et al., 2021)

Φύλλα και βιομάζα από το κλάδεμα

Η καλλιέργεια και συντήρηση των ελαιώνων, μέσα από διεργασίες όπως το εποχιακό κλάδεμα, η συγκομιδή, ο καθαρισμός των καρπών, καθώς και η επεξεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιотριβεία συνεισφέρουν στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων παραπροϊόντων ελαιουργίας, κυρίως με τη μορφή βιομάζας από τα φύλλα και τα ξυλώδη μέρη της ελιάς. Αυτά τα παραπροϊόντα είναι πλούσια σε φαινολικές ομάδες, όπως απλές φαινόλες, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή και μοιάζουν με

λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Ανάμεσα στις ενώσεις, οι πιο συνηθισμένες είναι η ελαιοευρωπαϊνή, η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, το βανιλικό, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ (Otero et al., 2021).

Υγρά παραπροϊόντα

Τα υγρά παραπροϊόντα ελαιοτριβείων (γνωστά και ως απόνερα) παράγονται κυρίως από τριφασικά ελαιοτριβεία, κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης, αλλά και από τα στάδια πλύσης και εκχύλισης των ελαιόκαρπων. Τα παραπροϊόντα αυτά αποτελούν σημαντική πηγή ρύπανσης και είναι δύσκολο να αποικοδομηθούν. Το 70-90% αυτών αποτελείται από νερό, ενώ η περιεκτικότητά τους σε οργανικά οξέα, σάκχαρα, ταννίνες (Otero et al., 2021) και μεταλλικά άλατα (Khwaldia et al., 2022) είναι σημαντική καθώς μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα, με αποδέκτες τους υδάτινους όγκους και το έδαφος. Το γεγονός αυτό οφείλεται βέβαια και στο pH τους, το οποίο χαρακτηρίζεται ως ελαφρώς όξινο (Otero et al., 2021). Όταν τα παραπροϊόντα αυτής της φάσης καταλήξουν σε επιφανειακά ύδατα μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στη δημιουργία ευτροφισμού, που επάγει συνθήκες ασφυξίας για τα υδρόβια ζώα και μειώνει τελικά τη βιοποικιλότητα. Οι αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν σε αυτά τα συστήματα, επάγουν τοξικότητα μέσω της παραγωγής ενώσεων όπως το μεθάνιο και η αμμωνία, ενώ επηρεάζουν αρνητικά και φυτικούς οργανισμούς με βλαστική δραστηριότητα όταν το πολυφαινολικό περιεχόμενο των υγρών απορροφάται από το έδαφος (Θεριός, 2005).

Στερεά παραπροϊόντα

1. Ελαιοπυρήνας (olive pomace): πρόκειται για το ημι-στερεό υπόλειμμα που απομένει μετά την απομάκρυνση του ακατέργαστου πυρηνέλαιου και περιλαμβάνει τον πυρήνα, το φλοιό και τη σάρκα της ελιάς. Αντιστοιχεί σε περίπου 40% του συνολικού βάρους της ελιάς, ενώ η υγρασία του εξαρτάται από το σύστημα εκχύλισης που χρησιμοποιείται κατά την παραγωγή ελαιόλαδου. Αναφορικά με τη σύστασή του, ο ελαιοπυρήνας έχει λιγνοκυτταρινούχα δομή και περιέχει επιπλέον υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και οργανική ύλη (Otero et al., 2021).

2. Ελαιοπυρηνόξυλο (olive cake): αποτελεί το ξηρό υπόλειμμα από την επεξεργασία του ελαιοπυρήνα για ανάκτηση υπολειμματικού πυρηνέλαιου. Είναι πλούσιο σε φυτοχημικά και βιοδραστικά μόρια όπως στερόλες, πεντακυκλικά τριτερπένια, βιταμίνη E, καροτενοειδή, μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και παράγωγα σεκοϊριδοειδών (Otero et al., 2021).

3. Πυρήνες/ ξυλώδες περίβλημα & ενδοσπέρμιο (olive stones): πρόκειται για στερεά παραπροϊόντα χαμηλής υγρασίας που προέρχονται από τη διαδικασία φυγοκέντρωσης. Η σύνθεσή τους περιλαμβάνει φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες, λιπίδια (ελαϊκό και λινολεϊκό οξύ) και φυτικές ίνες όπως η κυτταρίνη και η λιγνίνη/ ημικυτταρίνη σε ποσοστό 30-34% και 21-28% αντίστοιχα, ενώ ενδέχεται να περιέχουν επιπλέον σε μικρές συγκεντρώσεις τοκοφερόλες, στερόλες και σκουαλένιο (Otero et al., 2021).

1.1.6 Προοπτικές βιώσιμης διαχείρισης παραπροϊόντων ελιάς

Η ανεξέλεγκτη απόρριψη αποβλήτων ελαιοκομίας συνιστά πρόκληση λόγω των δυσμενών επιπτώσεων προς τα οικοσυστήματα. Παρόλα αυτά η βιοτεχνολογική διαχείρισή τους αναδεικνύεται ως μια καινοτόμα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση προς ενίσχυση της αειφορίας, παρέχοντας δυνητικά λύσεις για την αξιοποίηση παραπροϊόντων ελιάς με ισχυρό περιβαλλοντικό φορτίο.

Η ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από απόβλητα ελαιοτριβείων γίνεται είτε με παραδοσιακές μεθόδους (διαλύτες, φιλτράρισμα), είτε με προηγμένες τεχνολογίες μεμβρανών όπως μικροδιήθηση (MF), υπερδιήθηση (UF), νανοδιήθηση (NF) και αντίστροφη ώσμωση (RO), οι οποίες έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς σε πιλοτικά και βιομηχανικά επίπεδα. Παράλληλα, οι "πράσινες" τεχνολογίες εκχύλισης όπως η εκχύλιση με υπερήχους (UAE), με υπερκρίσιμο υγρό (SFE), με μικροκύματα (MAE), ή υγρό υπό πίεση (PLE), προσφέρουν τη δυνατότητα ανάκτησης ευαίσθητων ενώσεων χωρίς την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών που θα αλλοίωναν τη βιοδραστικότητά τους. Οι τεχνολογίες αυτές, παρέχουν υψηλές αποδόσεις, είναι φιλικές προς το περιβάλλον και συνδέονται με ταχεία επεξεργασία και χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση. Ακόμα, ενδείκνυνται για την αξιοποίηση των αγροβιομηχανικών αποβλήτων, καθώς μειώνουν το κόστος διαχείρισης και το περιβαλλοντικό

αποτύπωμα και ενισχύουν την κυκλική οικονομία (επαναχρησιμοποίηση και ανακύκλωση φυσικών πόρων που στοχεύει στη μείωση έως και εξάλειψη των αποβλήτων σε όλα τα στάδια παραγωγής προϊόντων).

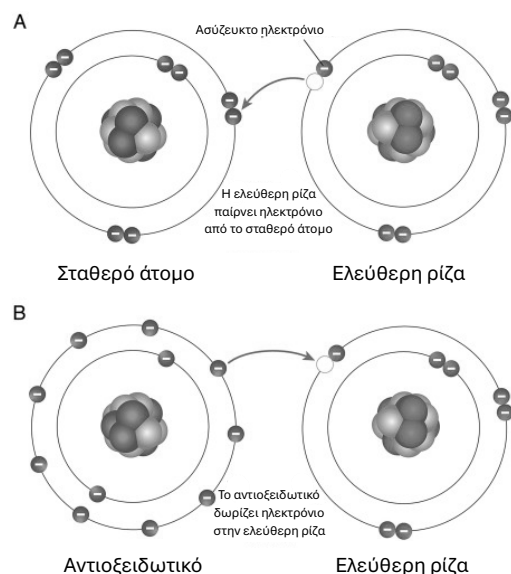
Το τελευταίο διάστημα, η βιομηχανία τροφίμων έχει στρέψει το βλέμμα της προς την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων και συστατικών που βελτιώνουν την υγεία. Ο όρος *superfoods* κερδίζει έδαφος σκιαγραφώντας τρόφιμα, η σύσταση των οποίων στηρίζεται σε βιοδραστικές ενώσεις με οφέλη για την υγεία, όπως η αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Το υγιεινό πρότυπο ζωής και η ταχέως αυξανόμενη και ακόρεστη ανάγκη για τρόφιμα ποιοτικά και ενισχυμένα με θρεπτικά έχουν ωθήσει την επιστημονική κοινότητα σε εντατική αναζήτηση νέων πηγών πολύτιμων και λειτουργικών συστατικών. Σε αυτό το πλαίσιο, τα παραπροϊόντα από την επεξεργασία της ελιάς έρχονται στο προσκήνιο ως μια υποσχόμενη, αλλά μέχρι πρότινος υποτιμημένη πηγή.

Εκχυλίσματα από παραπροϊόντα ελιάς παρέχουν δυνατότητες χρήσης ως φυσικά πρόσθετα και ενισχυτικά συστατικά σε τρόφιμα, φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα. Στον τομέα των τροφίμων, έχει εφαρμοστεί η ενσωμάτωσή τους στη φάση μάλαξης του παρθένου ελαιόλαδου, αυξάνοντας το φαινολικό περιεχόμενο και την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Otero et al., 2021). Αντίστοιχα, στον κλάδο της ζωικής παραγωγής, ενώσεις όπως οι πολυφαινόλες από ελαιοπυρήνα και φύλλα ελιάς αξιοποιούνται σε σιτηρέσια ζώων, ενισχύοντας την υγεία τους, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωικών προϊόντων και μειώνοντας την ανάγκη για χημικά πρόσθετα ή αντιβιοτικά (Chiofalo et al., 2020) (Rachwał & Gustaw, 2025). Στη γεωργία, ορισμένα από τα παραπροϊόντα ελιάς χρησιμοποιούνται ως φυσικά βιοδιεγερτικά, βιοφυτοφάρμακα και φυτοπροστατευτικά, βελτιώνοντας τις καλλιέργειες, με αντικατάσταση των επιβλαβών αγροχημικών (Sciubba et al., 2020). Ενώ σε φαρμακευτικούς και καλλυντικούς κλάδους, η πλούσια σε κυτταρίνη σύσταση των αποβλήτων επιτρέπει τη μετατροπή τους σε βιοδιασπώμενα υλικά συσκευασίας ως εναλλακτική στα συμβατικά πλαστικά. Τέλος, η υψηλή θερμογόνο δύναμη των αποβλήτων τα καθιστά εκμεταλλεύσιμα ενεργειακά καθώς προωθείται η χρήση τους ως βιοκαύσιμα για παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρικής ενέργειας (Otero et al., 2021).

Οι παραπάνω πρακτικές δεν είναι μόνο τεχνολογικά εφικτές, αλλά και οικονομικά βιώσιμες, προσφέροντας διπλό όφελος: Από τη μια ένα σημαντικό ποσό αποβλήτων απορροφάται εποικοδομητικά και από την άλλη προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας προάγονται. Καταληκτικά, η αξιοποίηση παραπροϊόντων ελιάς δεν αποτελεί μόνο λύση, αλλά και ευκαιρία για τη μετάβαση σε ένα πιο καινοτόμο, βιώσιμο και υγιεινό διατροφικό μοντέλο.

1.2 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που έχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα, δηλαδή τη στιβάδα σθένους. Ο χαμηλός χρόνος ζωής και η υψηλή δραστηριότητα τους οφείλεται στην αστάθεια εξαιτίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων που περιέχουν. Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ελευθέρων ριζών κυμαίνεται συνήθως από msec-nanosec και προκειμένου να σταθεροποιηθούν, οι ρίζες μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο από γειτονικά μόρια, ώστε αυτό να ζευγαρώσει με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους. Ο δότης ηλεκτρονίων μετατρέπεται με αυτόν τον τρόπο σε ελεύθερη ρίζα και η διαδικασία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών, η οποία είναι πιθανό σε δεύτερη φάση να βλάψει κυτταρικά συστατικά όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια ακόμα και το DNA. Φυσιολογικά οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η απόκριση του ανοσοποιητικού κ.α. Ωστόσο, η υπερβολική και ανεξέλεγκτη παραγωγή τους μπορεί να είναι δυνητικά επιζήμια (Khammash et al., 2023).



Εικόνα 3: Ελεύθερες ρίζες και αλληλεπίδραση με μόρια και αντιοξειδωτικά (Khammash et al., 2023)

1.2.1 Κατηγοριοποίηση ελευθέρων ριζών

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών που μπορούν να σχηματιστούν σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)
- Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)
- Δραστικές μορφές θείου (RSS)
- Δραστικές μορφές άνθρακα (RCS)

Σε κάθε περίπτωση η ονομασία του τύπου εξαρτάται από το κεντρικό άτομο που δομεί τη ρίζα. Οι δραστικές μορφές διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: τις ριζικές και τις μη ριζικές. Οι ελεύθερες ρίζες που απαντώνται συνηθέστερα είναι οι ROS και οι RNS. Οι ρίζες οξυγόνου περιλαμβάνουν:

- Ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
- Ρίζα υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$)
- Ρίζα περοϋδροξυλίου ($\cdot\text{HOO}$)
- Περοξυλική ρίζα ($\cdot\text{ROO}$)
- Αλκοξυλική ρίζα ($\text{RO}\cdot$)
- Λιπιδική περοξυλική ρίζα ($\text{LOO}\cdot$)

Ενώ οι μη ριζικές μορφές του στοιχείου αυτού αποτελούνται από:

- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)
- Μονήρες (διεγερμένο) οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

Αντίστοιχα οι RNS περιλαμβάνουν:

- Μονοξειδίο του αζώτου ($\cdot\text{NO}$)
- Διοξειδίο του αζώτου ($\cdot\text{NO}_2$)
- περοξυνιτρίτης (ONOO^-)
- Νιτρώδες ανιόν (NO_2^-)
- Ανιόν νιτροξυλίου (NO^-)
- Νιτρώδες οξύ (HNO_2)

(Singh & Kumar, 2017)

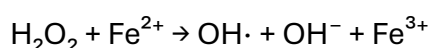
1.2.2 Ιδιότητες ορισμένων ελευθέρων ριζών

1. Ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Είναι η πιο συχνή δραστική μορφή οξυγόνου (ROS) που βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Παράγεται φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια, είτε μέσω ενζυμικών μονοπατιών (π.χ. από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης ή της NADPH οξειδάσης) είτε μέσω μη-ενζυμικών αντιδράσεων. Σε όξινο pH μπορεί να μετατραπεί σε υδροπεροξυλική ρίζα ($\text{HO}_2^{\cdot}$), η οποία είναι πιο λιπόφιλη ένωση. Μπορεί επίσης να είναι δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων, λειτουργώντας είτε ως αναγωγικός είτε ως οξειδωτικός παράγοντας, ενώ όταν αντιδράσει με άλλη ίδια ρίζα μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και οξυγόνου (O_2) μέσω της αντίδρασης που καταλύεται από τη σουπεροξειδική δισμουτάση.

2. Ρίζα υδροξυλίου ($\text{HO}^{\cdot}$)

Πρόκειται για την πιο δραστική μορφή ROS. Μπορεί να προκαλέσει διάφορες επιβλαβείς καταστάσεις στο κύτταρο καθώς επάγει σοβαρές βλάβες σε μόρια όπως DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες. Παράγεται κυρίως μέσω αντιδράσεων Fenton:



και αντιδράσεων Haber–Weiss:



3. Μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

Είναι η διεγερμένη μορφή του μοριακού οξυγόνου, και παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα διότι μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε σημαντικά μακρομόρια. Φυσιολογικά παράγεται από κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, αλλά και από ένζυμα όπως η λιποξυγενάση.

4. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το μόριο αυτό παράγεται από ουδετερόφιλα σε κατάσταση φλεγμονής, μέσω της δράσης του ενζύμου μυελοπεροξειδάση. Έχει την ικανότητα να οξειδώνει βιομόρια όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, και τα νουκλεοτίδια, ενώ μπορεί να χλωριώνει μεγαλομόρια όπως αμινοξέα, λιπίδια και DNA.

5. Μονοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}$)

Παράγεται από τα ένζυμα συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου (NOS) και εμπλέκεται σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αγγειοδιαστολή, η νευροδιαβίβαση και η ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων. Είναι λιπόφιλο, γεγονός που το καθιστά εύκολα και γρήγορα διαπερατό.

6. Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

In vivo παράγεται από το ένζυμο δισμουτάση σουπεροξειδίου (SOD). Ανήκει στις μη ρίζες και είναι ικανό να επιφέρει αλλοιώσεις σε κυτταρικό επίπεδο όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Είναι ικανό να διαπερνά εύκολα βιολογικές μεμβράνες, ωστόσο δεν έχει την ικανότητα άμεσης δράσης στο DNA, αλλά παρουσία μεταβατικών μετάλλων όπως το Fe^{2+} μπορεί να παράγει ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικές. (Phaniendra et al., 2015)

1.2.3 Προέλευση και πορεία δημιουργίας ελευθέρων ριζών

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν τόσο μέσω ενδογενών όσο και μέσω εξωγενών διεργασιών. Ενδογενώς, οι ρίζες αποτελούν παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και ο σχηματισμός τους είναι αποτέλεσμα ενζυμικών και μη

αντιδράσεων. Τα οργανίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία των ROS είναι τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση του O_2 είναι υψηλή.

Μιτοχόνδρια: Αποτελούν την κύρια ενδοκυτταρική πηγή ενέργειας, και κατά συνέπεια ROS. Σε αυτά απαντάται η αναπνευστική αλυσίδα/ αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οποίας τα σύμπλοκα I (NADH αφυδρογονάση) και III (οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c) εμπλέκονται στην παραγωγή ριζών υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Κατά τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα σύμπλοκα αυτά στο συνένζυμο Q (ουβικινόνη), και αντίστροφα, μπορούν να σχηματιστούν υπεροξειδικές ρίζες. Η πορεία αυτή είναι μη ενζυμική και όσο αυξάνεται ο μεταβολικός ρυθμός και η κατανάλωση O_2 , τόσο αυξάνεται και η παραγωγή ROS. Η υπεροξειδική ρίζα ($O_2^{\cdot-}$) μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (MnSOD). Τα ένζυμα καταλάση (CAT) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) μπορούν να μετατρέψουν ακολούθως το H_2O_2 σε οξυγόνο και νερό. Άλλα μιτοχονδριακά ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή ROS είναι η μονοαμινοοξειδάση, η αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού, η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκερόλης και η πρωτεΐνη p66Shc. Ιδιαίτερα, η p66Shc είναι μία ισομορφή της οικογένειας πρωτεϊνών ShcA που εμπλέκονται στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, η πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, και να αλληλεπιδρά με το κυτόχρωμα-c, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της παραγωγής των ROS.

Υπεροξεισώματα: Στα υπεροξεισώματα, η μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες προς το μοριακό οξυγόνο μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό των οργανιδίων αυτών, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 . Εκτός από το H_2O_2 βέβαια, στα οργανίδια αυτά σχηματίζονται επίσης και άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$) και το μονοξειδίο του αζώτου ($\cdot NO$). Τα βασικά ένζυμα των υπεροξεισωμάτων που συμμετέχουν στη δημιουργία ROS, είναι:

- Ακυλο-CoA οξειδάσες
- Οξειδάση D-αμινοξέων
- Οξειδάση ουρικού οξέος
- Οξειδάση ξανθίνης

Ενδοπλασματικό δίκτυο: Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) είναι ένα εκτεταμένο σύστημα μεμβρανών εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων, το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων, καθώς και στη διαδικασία αποτοξίνωσης ουσιών. Το ΕΔ περιέχει πλήθος ενζύμων που μπορούν να συμβάλουν στην παραγωγή ROS. Αυτά είναι: οι οξειδάσες της διαμίνης και των θειολών, ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 και b5.

Κυτόχρωμα P-450: Πρόκειται για μία υπεροικογένεια ενζύμων, που απαντώνται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη του ΕΔ, και είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό ενός μεγάλου φάσματος ενδογενών και εξωγενών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων και των τοξινών. Κατά τη λειτουργία τους, τα κυτοχρώματα χρησιμοποιούν το σύστημα NADPH-κυτοχρωμική P450 αναγωγή, από το οποίο μπορεί να διαρρεύσουν ηλεκτρόνια με αποδέκτη το οξυγόνο, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

Άλλες ενδογενείς πηγές:

- φαγοκυττάρωση: η κυτταρική διαδικασία, κατά την οποία τα κύτταρα (ηωσινόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, οστεοκλάστες κ.α.) εγκολπώνουν μικροοργανισμούς ή σωματίδια από την εξωκυττάρια μήτρα προς αποικοδόμηση, συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα παραγωγής ROS από ένζυμα όπως η NADPH οξειδάση και η μυελοπεροξειδάση,
- φλεγμονώδης απόκριση και
- ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων: η ιστική βλάβη που πυροδοτεί την ενεργοποίηση τοπικών και συστηματικών μηχανισμών, στρατολογεί μεταξύ άλλων ανοσοκύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν χημειοτακτικά και παράγουν ρίζες μέσω ενζύμων.

(Phaniendra et al., 2015)

Εξωγενώς, ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από περιβαλλοντικούς ρύπους και τοξίνες όπως ο καπνός του τσιγάρου και τα βαρέα μέταλλα (Hg, Pb, Cd), από την υπεριώδη (UV) και ιονίζουσα ακτινοβολία (ραδιενέργεια) (ακτίνες-γ και -χ), την ατμοσφαιρική ρύπανση, την έκθεση σε χημικά και φάρμακα, τρόφιμα, αλκοόλ, χημικοθεραπευτικούς και λοιμώδεις παράγοντες (Bisht & Dada, 2017).

Οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν τρεις φάσεις: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Σε πρώτη φάση, σταθερά μόρια μπορούν να διασπαστούν ομοιοπολικά δημιουργώντας μόρια με μονήρη ηλεκτρόνια στα εξωτερικά ατομικά τροχιακά τους. Σε δεύτερη φάση, αυτά τα μόρια υψηλής ενεργειακής κατάστασης μπορούν να αντιδράσουν με άλλα ουδέτερα μόρια για να αποκατασταθεί η ισορροπία, δίνοντας έτσι γένεση σε νέες ελεύθερες ρίζες. Στην τρίτη φάση, η αλυσιδωτή αντίδραση σταματά μέσω της ένωσης δύο ελευθέρων ριζών προς το σχηματισμό ενός τελικού σταθερού μορίου (Tumilaar et al., 2024).

1.2.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών είναι διττός. Όταν παράγονται σε αυξημένες ποσότητες και υπερβαίνουν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (αδυναμία εξουδετέρωσης) μπορούν να επάγουν οξειδωτικό στρες. Μέσω μιας σειράς από αντιδράσεις με στόχο βιολογικά μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, μπορούν να οδηγήσουν στη βλάβη των κυττάρων.

Βλάβες σε DNA και RNA: Οι ROS, και ιδιαίτερα η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), έχουν την ικανότητα να προσβάλλουν το DNA προκαλώντας βλάβες όπως μεταλλάξεις, ρήξεις μονής και διπλής έλικας, και αλλοιώσεις στις βάσεις του γενετικού υλικού. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε τέτοιου είδους αλλοιώσεις λόγω της εγγύτητάς του με τις πηγές ROS, καθώς στα μιτοχόνδρια παράγονται διαρκώς ελεύθερες ρίζες, και λόγω της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης. Οι RNS μπορούν να προκαλέσουν νιτρωτικές αλλοιώσεις όπως η 8-νιτρογουανίνη, που σχετίζεται με μεταλλάξεις και δυνητικά με καρκινογένεση. Αναφορικά με τα ριβονουκλεϊκά οξέα, το RNA λόγω της μονής του έλικας και της μικρότερης πρωτεϊνικής του προστασίας είναι

πιο επιρρεπές σε οξειδωτική βλάβη. Οξειδωμένες μορφές αυτού, όπως η 8-οχοG, έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές και καρδιαγγειακές νόσους.

Οξειδωση πρωτεϊνών: Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσβάλλουν επίσης αμινοξέα όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, προκαλώντας μείωση ή και απώλεια της λειτουργικότητας των ενζύμων, καθώς και διαταραχές στη σηματοδότηση και την αποδόμηση των πρωτεϊνών. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες περιέχουν χαρακτηριστικές καρβονυλομάδες, που χρησιμοποιούνται και ως δείκτες πρωτεϊνικής βλάβης. Τέτοιες βλάβες έχουν συσχετιστεί με νόσους όπως Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον, ρευματοειδής αρθρίτιδα και διαβήτης (Phaniendra et al., 2015).

Λιπιδική υπεροξειδωση: Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών μπορούν να αποτελέσουν στόχους των ROS και να οξειδωθούν οδηγώντας σε απώλεια της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης, δυσλειτουργία των υποδοχέων της, και σχηματισμό τοξικών προϊόντων όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυλενενάλη (4-HNE), που προκαλούν δυνητικά δευτερογενείς βλάβες σε DNA και πρωτεΐνες (Ayala et al., 2014).

Σε φυσιολογικά επίπεδα ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες για την υγεία και επιτελούν σημαντικούς βιολογικούς και αμυντικούς ρόλους. Αυτοί σχετίζονται με:

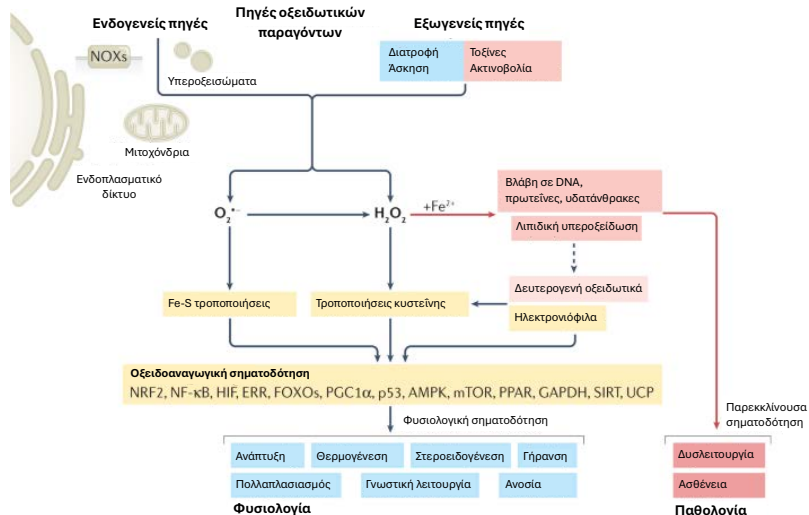
Ανοσολογική άμυνα: Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, και συγκεκριμένα τα ουδετερόφιλα, μακροφάγα και μονοκύτταρα παράγουν και αποθηκεύουν ROS (π.χ. $O_2^{\cdot-}$) με στόχο την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών που εισβάλλουν στο κύτταρο. Αυτή η λειτουργία είναι ζωτικής σημασίας για την έμφυτη ανοσία, γνωστή και ως φυσική.

Ρύθμιση κυτταρικής σηματοδότησης: Οι ROS και RNS συμμετέχουν σε σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων, την απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, την απόπτωση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μάλιστα, τα ένζυμα οξειδάσες του NADPH (μη-φαγοκυτταρικές ισομορφές) παράγουν ROS σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, καρδιομυοκύτταρα, θυρεοειδικά κύτταρα, κ.ά.

Μιτογόνο αποκρίση: Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικές συνθήκες, στοιχείο σημαντικό για την επούλωση και αναγέννηση ιστών.

Ρύθμιση νευρωνικής και αγγειακής λειτουργίας: Το μονοξείδιο του αζώτου συνιστά αγγειοδιασταλτικό παράγοντα που ρυθμίζει τη ροή αίματος και αναστέλλει τη θρόμβωση ενώ συγχρόνως δρα και ως νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ.

Αντικαρκινική δράση και θανάτωση παθογόνων: Το μονοξείδιο του αζώτου συμμετέχει επίσης στη μη ειδική άμυνα έναντι ενδοκυττάρων παθογόνων και καρκινικών κυττάρων-μέσω οξειδωτικής καταστροφής τους (Pizzino et al., 2017), (Pham-Huy et al., 2008).



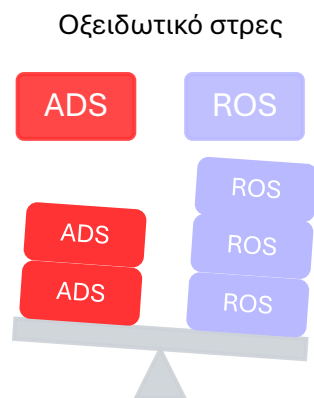
Εικόνα 4: Δραστικές μορφές και ρόλος σε κυτταρική βιολογία, φυσιολογία και παθολογία (Sies et al., 2022) *NOXs=οξειδάσες του NADPH στην κυτταρική μεμβράνη

1.3 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες καθιερώθηκε αρχικά ως μια διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, υπέρ των πρώτων. Ωστόσο, αυτή η απλή περιγραφή που επικράτησε για περισσότερο από 25 χρόνια δεν θεωρήθηκε επαρκής, καθώς παράβλεπε τη βιολογική πολυπλοκότητα του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού συστήματος και τον σηματοδοτικό ρόλο των ROS (Powers et al., 2011). Προκειμένου να αποδοθεί πιο ορθά η έννοια του οξειδωτικού στρες, ο Dean Jones και ο Helmut Sies πρότειναν έναν πιο σύγχρονο ορισμό:

«Οξειδωτικό στρες είναι η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων υπέρ των οξειδωτικών, η οποία οδηγεί είτε σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ρύθμισης είτε/και σε μοριακή βλάβη».

Αυτός ο πιο ολιστικός και περιεκτικός ορισμός αναγνώρισε τον διπλό ρόλο των ROS ως τοξικών μορίων, αλλά και ως σηματοδοτικών παραγόντων και ενσωμάτωσε τη σημασία της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στη διατήρηση της κυτταρικής φυσιολογίας (Sies et al., 2017).



Εικόνα 5: Διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας

*ADS= antioxidant defense system

Σήμερα, το οξειδωτικό στρες αποδίδεται ως μια παροδική ή μακροχρόνια αύξηση των σταθερών επιπέδων ROS, που διαταράσσει τις μεταβολικές και σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, ιδιαίτερα τις ROS-εξαρτώμενες και οδηγεί σε οξειδωτικές τροποποιήσεις μακρομορίων, οι οποίες αν δεν αντιμετωπιστούν, μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης (Lushchak & Storey, 2021).

1.3.1 Συστήματα ταξινόμησης οξειδωτικού στρες

Χρονική ταξινόμηση:

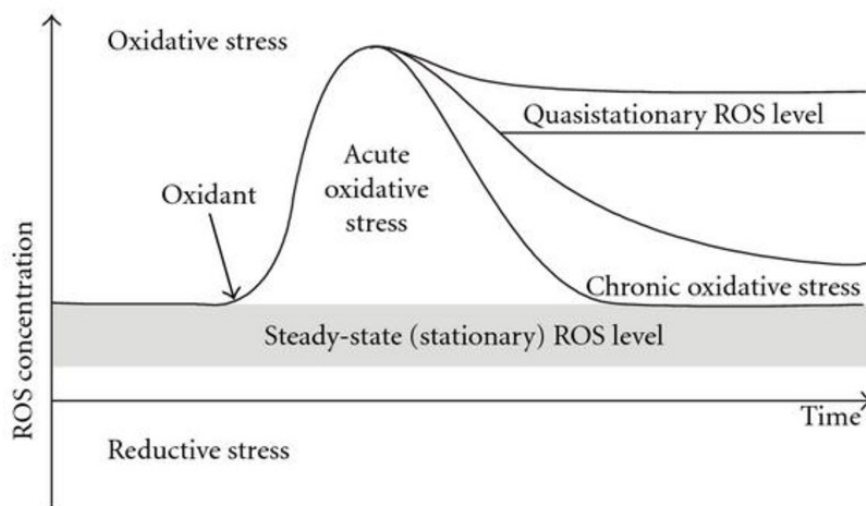
Πίνακας 1: Ταξινόμηση των διαφόρων ειδών στρες του κυττάρου βάσει του χρόνου εμφάνισης (Lushchak & Storey, 2021)

Τύπος στρες	Χαρακτηριστικά
Οξύ οξειδωτικό στρες	Βραχυπρόθεσμη αύξηση των ROS (λεπτά)

	Το κύτταρο αποκαθιστά γρήγορα την ισορροπία
	Δεν απαιτείται γονιδιακή έκφραση
Χρόνιο οξειδωτικό στρες	Μακροχρόνια αύξηση των ROS (ώρες, ημέρες, ή παραπάνω)
	Ενεργοποίηση γονιδίων του στρες
	Δύο είδη: ήπια παρατεταμένη αύξηση Σταθεροποίηση σε νέο υψηλότερο επίπεδο
Αναγωγικό στρες	Μείωση των ROS
	Αυξημένα επίπεδα GSH, NAD(P)H
	Μπορεί να είναι εξίσου επιζήμιο

Η χρονική ταξινόμηση βασίζεται δηλαδή σε δύο κριτήρια:

1. Διάρκεια μεταβολής των επιπέδων των ROS σε σχέση με τη φυσιολογική σταθεροποιημένη κατάσταση
2. Βιολογική αντίδραση του κυττάρου με βάση το χρόνο



Εικόνα 6: Χρονική ταξινόμηση του οξειδοαναγωγικού στρες (Lushchak, 2012)

Ταξινόμηση με βάση την ένταση:

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των διαφόρων ειδών στρες του κυττάρου βάσει της έντασης (Lushchak & Storey, 2021)

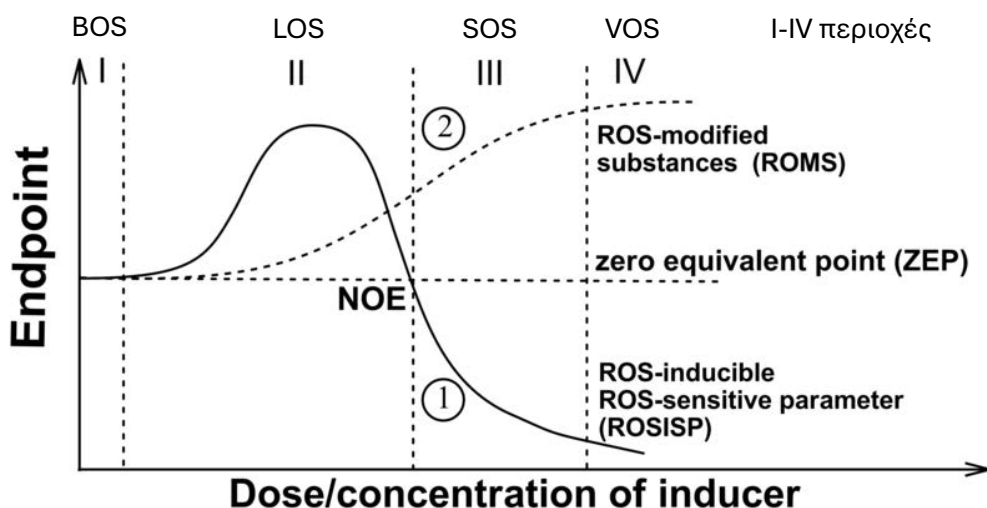
Τύπος στρες	Περιοχή (εικόνα 7)	Χαρακτηριστικά
-------------	--------------------	----------------

BOS (βασικό οξειδωτικό στρες)	Περιοχή I	Δεν ανιχνεύονται αλλαγές λόγω μικρών ποσοτήτων ROS
LOS (χαμηλής έντασης οξειδωτικό στρες)	Περιοχή II	Ελαφρώς αυξημένες μεταβολές σε βιομόρια-ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών (up- regulation)
SOS (ισχυρό οξειδωτικό στρες)	Περιοχή III	Απώλεια αμυντικών μηχανισμών (inactivation)- υψηλά ROMS
VOS (πολύ ισχυρό οξειδωτικό στρες)	Περιοχή IV	Ολική απορρύθμιση- ROSISP σχεδόν μηδενικά

Η ταξινόμηση αυτή συνεπώς βασίζεται:

1. Στο ποσοτικό μέγεθος της πρόκλησης δηλαδή στη δόση/ ένταση/ συγκέντρωση των ROS/ οξειδωτικών παραγόντων
2. Στα βιολογικά αποτελέσματα, που μετρώνται χάρη σε δύο κατηγορίες

ROSISP (ROS-inducible ROS-sensitive parameters)	Ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων
	Ενεργοποιούνται/ αδρανοποιούνται από ROS
ROMS (ROS-modified substances)	Μόρια που έχουν οξειδωθεί από ROS (π.χ. DNA, πρωτεΐνες)



Εικόνα 7: Ταξινόμηση του στρες βάσει έντασης επαγωγέα (Lushchak, 2016)

1: καμπύλη που δείχνει την πορεία μιας παραμέτρου ευαίσθητης και επαγόμενης από ROS (ROSISP) π.χ. δραστηριότητα αντιοξειδωτικού ενζύμου, 2: καμπύλη που δείχνει την πορεία μιας κυτταρικής ουσίας τροποποιημένης από ROS (ROMS), ZEP: μηδενικό ισοδύναμο σημείο όπου τα επίπεδα των συστατικών ενδιαφέροντος αντιστοιχούν στο αρχικό (βασικό) επίπεδο απουσία επαγωγέα οξειδωτικού στρες, NOE: σημείο μη παρατηρήσιμου αποτελέσματος.

Οι τύποι BOS, LOS (I, II περιοχές) αντιστοιχούν σε οξειδωτικό eustress, δηλαδή σε ήπιο/ φυσιολογικό στρες και οι SOS, VOS (III, IV περιοχές) σε οξειδωτικό distress, δηλαδή σε ισχυρό στρες που προάγει τη βλάβη του κυττάρου, και αυτό γιατί το σήμα των ROS από ωφέλιμο μεταβαίνει σε ζημιογόνο.

(Lushchak & Storey, 2021)

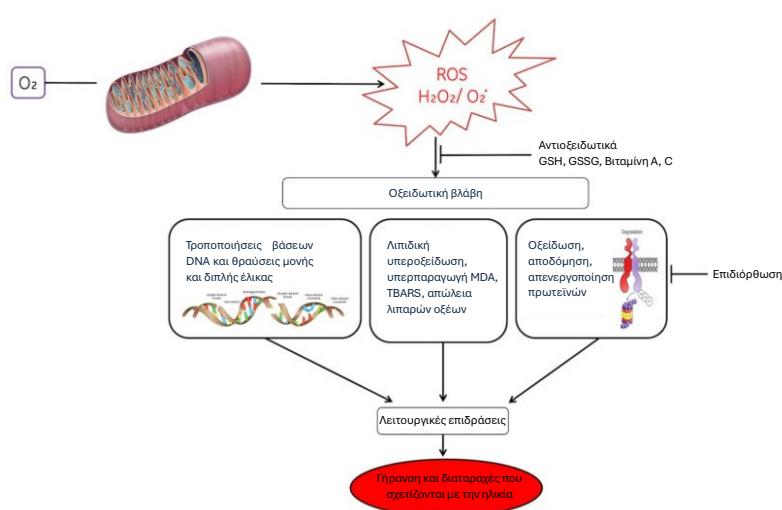
1.3.2 Οξειδωτικό στρες και παθογένεια

Πέρα από τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορούν να επάγουν οι ROS σε κυτταρικές δομές, η αδυναμία εξουδετέρωσης τους μπορεί να προκαλεί αλλοιώσεις σε διάφορα οργανικά συστήματα, με αποτέλεσμα να εξελίσσονται πολυάριθμες και ποικίλες παθολογίες στο ανθρώπινο σώμα. Αυτές συνήθως περιλαμβάνουν χρόνιες, και τελικού σταδίου νεφρικές παθήσεις, καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, διαβήτη, παχυσαρκία ακόμα και γήρανση και στηρίζονται κυρίως στα επιμέρους όργανα:

Εγκέφαλος και νευρικό σύστημα: Το οξειδωτικό στρες είναι ικανό να επάγει νευροτοξικότητα και να τροποποιεί τους νευρώνες κατά τρόπο τέτοιο που τελικά επηρεάζεται η διαπερατότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης, μειώνεται η διεγερσιμότητά της, και ενεργοποιείται η αντλία K-ATP (ATP-εξαρτώμενη αντλία καλίου) που είναι υπεύθυνη για τη μεταβολή της ιοντικής ισορροπίας.

Καρδιά: Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται επίσης σε φαινόμενα μιτοχονδριακής βλάβης, ρήξης της μεμβράνης των οργανιδίων αυτών, απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, καθώς και ενεργοποίησης του καταρράκτη απόπτωσης, γεγονότα που δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε καρδιομυοπάθειες.

Ήπαρ και νεφροί: Τα όργανα αυτά αποτελούν τον άμεσο στόχο των ROS καθώς εμπλέκονται σε μεταβολικές και διηθητικές διεργασίες, αντίστοιχα. Αναλυτικά, στο συκώτι οι ROS είναι ικανές να βλάπτουν τις μεμβράνες των ηπατοκυττάρων με αποτέλεσμα να προκαλείται κίρρωση του ήπατος και ίνωση. Επίσης, ατελής οξείδωση βιομορίων στο όργανο αυτό μπορεί να προάγει την απόπτωση προκαλούμενη από υπερβολική συσσώρευση λιπιδίων στο κύτταρο και τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Στους νεφρούς, οι ROS μπορούν επίσης να ενεργοποιούν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, επάγοντας έτσι τη φλεγμονή και την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας.



Εικόνα 8: Μόρια-στόχοι των ROS και παθολογικές καταστάσεις

(Hajam et al., 2022)

1.3.3 Προσαρμοστική απόκριση στο οξειδωτικό στρες

Γενικά οι ROS μπορούν να αντιμετωπιστούν από διάφορες αναγωγικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων μικρών μορίων ανάγωγης, οξειδοαναγωγικών ενζύμων και οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών. Ένα σύστημα ανίχνευσης οξειδωτικών και ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων ευθύνεται για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που με τη σειρά τους επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων του πυρήνα τα οποία κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα (NQO1, GPX4, TXN). Τέτοιοι παράγοντες είναι οι AP-1, HO-1 και Nrf-2, με τον τελευταίο να αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή. Τα ενδογενή προϊόντα που παράγονται τελικά, είναι ικανά να αντιμετωπίζουν τις ROS πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με εξωγενή μόρια και κατηγοριοποιούνται σε πρώτη και δεύτερης γραμμής άμυνας αντιοξειδωτικά. Η πρώτη γραμμή περιλαμβάνει ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η δεύτερη γραμμή συνένζυμα όπως NADPH και ένζυμα όπως η συνθετάση γλουταθειόνης, η αναγωγή γλουταθειόνης και θειορεδοξίνης (Li et al., 2025).

Το βιολογικό φαινόμενο της όρμησης περιγράφει την θετική απόκριση του οργανισμού έπειτα από έκθεσή του σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε στρεσογόνο παράγοντα, ο οποίος εάν υπήρχε σε υψηλές συγκεντρώσεις θα είχε βλαπτική δράση τόσο για το κύτταρο, όσο και για ολόκληρο τον οργανισμό (Wan et al., 2024). Η δυναμική του φαινομένου αυτού έγκειται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι υψηλών επιπέδων στρες, και ενεργοποιείται μέσω ερεθισμάτων όπως η υπερ- ή υπο-θερμία, η ισχαιμία, ο πόνος, ο θόρυβος, η αυπνία και η σωματική άσκηση. Η τελευταία μάλιστα, λόγω της έντονης μυϊκής δραστηριότητας, μπορεί να προάγει την παραγωγή ROS, με τη μικρή αύξηση να είναι ικανή να ενεργοποιεί την κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα. Το H_2O_2 μέσω του παράγοντα NFκB μπορεί συνεπώς να συμβάλλει στην παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενισχύοντας τους μηχανισμούς αποτοξίνωσης μέσω de novo πρωτεϊνσύνθεσης και διατήρησης των υπαρχόντων αποθεμάτων (Ji & Yeo, 2021).

1.4 Αντιοξειδωτικά

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα γύρω από τα αντιοξειδωτικά έχει ενταθεί, καθώς θεωρούνται βασικοί σύμμαχοι στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και στην πρόληψη πολλών ασθενειών. Ο όρος αντιοξειδωτικά αναφέρεται σε φυσικές ή συνθετικές ουσίες (Nie et al., 2018) που αποτρέπουν ή καθυστερούν την οξείδωση του υποστρώματος τους, ακόμα και όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Grant & Chapple, 2009). Συνήθως είναι ένζυμα ή οργανικές ενώσεις που μπορούν να αντισταθμίσουν την επιβλαβή επίδραση της οξείδωσης στους ιστούς (Nie et al., 2018), μέσω της ικανότητας τους να δίνουν ηλεκτρόνια (Tumilaar et al., 2024). Αντιοξειδωτικά θεωρούνται ωστόσο και ενώσεις που δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων με στόχο την αποκατάσταση των ασύζευκτων ηλεκτρονίων σθένους. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού αντιοξειδωτικού μορίου ορίζονται ως: η δυνατότητα για άμεση απορρόφηση από τον οργανισμό, η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, η ικανότητα χηλικοποίησης (σύμπλοκα ιόντων/ μορίων με μέταλλα), η δράση τόσο σε υδατικά όσο και σε μεμβρανικά περιβάλλοντα, και η θετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Azat Aziz et al., 2019). Σχεδόν όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, τόσο οι προκαρυώτες όσο και οι ευκαρυώτες, είναι ικανοί να παράγουν βιοδραστικές ενώσεις. Συγκριτικά με τα φυτά όμως, μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, κυανοβακτήρια, μύκητες κ.α. καθίστανται σημαντική πηγή βιοδραστικών μορίων με βιομηχανικές εφαρμογές, εξαιτίας της ικανότητας τους για ταχεία ανάπτυξη υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες (Flieger et al., 2021).

1.4.1 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους:

1. Βάσει της βιολογικής τους δράσης
2. Βάσει των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων (διαλυτότητα)
3. Βάσει του μεγέθους τους
4. Βάσει της προέλευσης τους (Azat Aziz et al., 2019)
5. Βάσει του μηχανισμού δράσης τους (Flieger et al., 2021)

1α. Ενζυμικά: Σημαντικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRd) (Flieger et al., 2021).

Οι ενώσεις αυτές απαιτούν για τη δράση τους συνένζυμα όπως ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn), το μαγγάνιο (Mn), το σελήνιο (Se) και ο σίδηρος (Fe) και έχουν την ικανότητα μετατροπής του H_2O_2 σε νερό.

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά με βάση την κινητική διακρίνονται επιμέρους σε:

- Αντιοξειδωτικά που δρουν σε ρίζες περοξυλίου
- Αντιοξειδωτικά που αλληλεπιδρούν με αλκυλορίζες
- Αντιοξειδωτικά που τερματίζουν κυκλικές αλυσίδες
- Αντιοξειδωτικά που αποσυνθέτουν υπεροξείδια
- Αντιοξειδωτικά που αδρανοποιούν μέταλλα
- Αντιοξειδωτικά που δρουν συνεργειακά

1β. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά: Από τα σημαντικότερα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά αναφέρονται η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή, και η γλουταθειόνη.

Τα αντιοξειδωτικά αυτά δρουν διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών.

2α. Λιποδιαλυτά

2β. Υδατοδιαλυτά: π.χ. βιταμίνη C που απαντάται σε κυτταρικά υγρά

3α. Μικρού μοριακού βάρους: εξουδετερώνουν ROS μέσω δέσμευσης, μεταφοράς και απομάκρυνσης τους, τέτοια είναι η βιταμίνη C, βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, και η γλουταθειόνη.

3β. Μεγάλου μοριακού βάρους: περιλαμβάνουν ένζυμα (SOD, CAT, GPx) και πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, που απορροφούν τις ROS και εμποδίζουν τη βλάβη άλλων σημαντικών πρωτεϊνών.

4α. Φυσικά: Μετατρέπουν ρίζες σε σταθερά προϊόντα. Συνήθως έχουν φαινολική δομή και περιλαμβάνουν:

Αντιοξειδωτικά μέταλλα: Συμπαράγοντες όπως σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος και μαγγάνιο. Η έλλειψή τους επηρεάζει τον μεταβολισμό πολλών μακρομορίων.

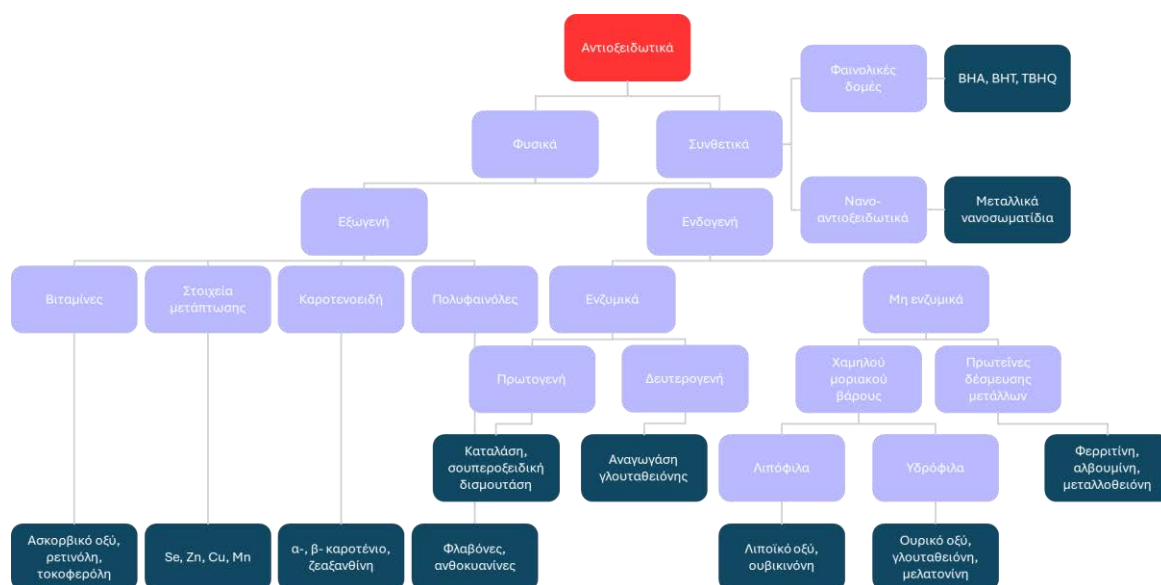
Αντιοξειδωτικές βιταμίνες: Όπως οι βιταμίνες C, E και B, που είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό.

Φυτοχημικά: Φαινολικά παράγωγα που δεν είναι ούτε βιταμίνες ούτε μέταλλα. Παραδείγματα: φλαβονοειδή, κατεχίνες, καροτενοειδή καροτένιο, βότανα και μπαχαρικά (π.χ. δενδρολίβανο, θυμάρι, γαρύφαλλο, πιπέρι, τζίντζερ, σκόρδο, κουρκουμίνη).

4β. Συνθετικά: φαινολικές ενώσεις που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Παραδείγματα: EDTA (μεταλλοχηλικός παράγοντας), PG, BHT, BHA κ.α. (Azat Aziz et al., 2019)

5α. Πρωτογενή: έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ενεργά τις οξειδωτικές αντιδράσεις εξουδετερώνοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου/ αζώτου (ROS/ RNS).

5β. Δευτερογενή: Δρουν έμμεσα/ προληπτικά στοχεύοντας σε παράγοντες που επάγουν την οξείδωση και την αντιοξειδωτική άμυνα (π.χ. ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 που με τη σειρά του ενεργοποιεί ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα). (Flieger et al., 2021)



Εικόνα 9: Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών (Flieger et al., 2021)

1.4.2 Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών

1. Εξουδετέρωση ή σταθεροποίηση ελευθέρων ριζών μέσω δέσμευσης

Τα αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και η δραστηριότητά τους σχετίζεται σημαντικά με τον αριθμό των ενεργών ομάδων που περιέχουν, όπως οι υδροξυλομάδες ($-OH$) ή οι αμινομάδες ($-NH_2$), καθώς και με τη θέση αυτών (όρθο, πάρα, μέτα) (Flieger et al., 2021).

2. Περιορισμός της διαθεσιμότητας χηλικών μεταβατικών μετάλλων

Αν και τα ιχνοστοιχεία όπως ο σίδηρος και ο χαλκός είναι απαραίτητα για τη διατροφή, μπορούν επίσης να δρουν ως προοξειδωτικά, ενισχύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Τα ιόντα Fe^{2+} και Cu^+ αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) το οποίο προέρχεται από την αποδόμηση του $O_2 \cdot^-$ μέσω του ενζύμου SOD, και σχηματίζουν την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($OH \cdot$).

Επιπλέον, τα οξειδωμένα ιόντα Fe^{3+} και Cu^{2+} μπορούν να αναχθούν ξανά με τη βοήθεια αναγωγικών ουσιών όπως το NADH ή η βιταμίνη C, οδηγώντας σε νέο κύκλο παραγωγής $OH \cdot$. Οι ρίζες $OH \cdot$ είναι εξαιρετικά δραστικές και μπορούν να αντιδράσουν με πρωτεΐνες και λιπίδια, προκαλώντας βλάβες όπως η λιπιδική υπεροξείδωση και ο σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Η χηλικοποίηση των μεταλλικών ιόντων μπορεί να μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητά τους και επομένως να περιορίζει τον σχηματισμό ROS, προστατεύοντας το DNA και άλλα κυτταρικά συστατικά από οξειδωτική βλάβη. Έχει αποδειχθεί, για παράδειγμα, ότι το σελήνιο μπορεί να χηλικοποιεί πολύ αποτελεσματικά τα ιόντα Cu^+ και να αποτρέπει την καταστροφή του DNA από $OH \cdot$.

3. Αναστολή της δράσης ενζύμων που παράγουν ελεύθερες ρίζες

Ένζυμα όπως οι οξειδάσες του NADPH και της ξανθίνης (XO) αποτελούν βασικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών και ιδιαίτερα της ανιονικής ρίζας σουπεροξειδίου ($O_2 \cdot^-$) με εμπλοκή τόσο σε φυσιολογικές (όπως η καταστροφή παθογόνων από τα φαγοκύτταρα) όσο και σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Η θετική ρύθμισή τους μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες όπως η οξείδωση της LDL, ιδιαίτερα σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο ή νεφρική ανεπάρκεια. Η

αναστολή αυτών των ενζύμων με φυσικά αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη Ε, πολυφαινόλες) ή με ειδικούς αναστολείς (ΑΕΒSF, αλλοπουρινόλη) παρουσιάζει ιδιαίτερο θεραπευτικό ενδιαφέρον. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες πειραματικές μέθοδοι (φασματοφωτομετρικές και φθορίζουσες) για τη μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας και της αποτελεσματικότητας των αναστολέων.

4. Ενεργοποίηση εσωτερικών αντιοξειδωτικών ενζύμων

Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του κυττάρου, είναι δυνατόν να παράγονται ROS. Ως απόκριση και άμυνα έναντι των βλαβών που προκαλούνται από αυτές, εκφράζονται ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα που αποτρέπουν τις κρίσιμες επιπτώσεις.

Τέτοια ένζυμα είναι:

- Σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD): Μετατρέπει δύο μόρια $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και O_2 . Το ενεργό κέντρο της περιέχει μέταλλα (Cu, Mn, Fe ή Ni).
- Καταλάση (CAT): Αποδομεί το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο, προστατεύοντας από τη δημιουργία $\cdot OH$ μέσω της αντίδρασης Fenton.
- Αναγωγή γλουταθειόνης (GRd): Αναγεννά τη GSH από τη GSSG, διατηρώντας τον λόγο GSH/GSSG που συνιστά δείκτη του οξειδωτικού στρες.
- Αναγωγή θειορεδοξίνης (TrxR): Μειώνει τη θειορεδοξίνη (Trx) και συμμετέχει σε ρυθμίσεις οξειδοαναγωγής και σύνθεση DNA.

Φυσικές ενώσεις όπως οι ανθοκυανίνες, η σεληνομεθειονίνη, η κουρκουμίνη και η ρεσβερατρόλη φαίνεται να ενεργοποιούν ή να τροποποιούν ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά ένζυμα. Αναλυτικά, οι ανθοκυανίνες δρουν ως χημειοπροστατευτικά φυτοχημικά, ενεργοποιώντας το ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό σύστημα. Η σεληνομεθειονίνη (SeMet) προάγει την παραγωγή των σεληνοπρωτεϊνών, όπως η ενεργή GPX ενώ η κουρκουμίνη αναστέλλει την TrxR, μετατρέποντας τη λειτουργία της από αντιοξειδωτική σε προοξειδωτική, που συνεπάγεται την προστατευτική της δράση κατά του καρκίνου. Τέλος, η ρεσβερατρόλη αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα της MnSOD στα μιτοχόνδρια, παρέχοντας κυτταρική προστασία.

5. Αποτροπή οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικά μακρομόρια

Αντιοξειδωτικά όπως το σελήνιο μπορούν να αναστείλουν την επαγόμενη από $\cdot\text{OH}$ ρήξη της αλυσίδας του DNA, ενώ φαινόλες καθώς και ένζυμα όπως SODs και CATs μπορούν να αποτρέψουν την αλλοίωση πρωτεϊνικής δομής ή λειτουργίας που προκαλείται από ROS, περοξυνιτρίτη και υποχλωριώδες οξύ. Τέλος, βιταμίνες και φλαβονοειδή έχουν συσχετιστεί με την παρεμπόδιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης μέσω εξουδετέρωσης των δραστικών ειδών (Lü et al., 2010), (Azat Aziz et al., 2019)

1.4.3 Συνήθη αντιοξειδωτικά

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές τετρατερπενοειδείς (C_{40}) πολυενικές χρωστικές ουσίες, που απαντώνται ευρέως σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες, άλγη και φυτά (Lu et al., 2021). Αν και δεν συντίθενται από τον άνθρωπο, ανιχνεύονται στο αίμα και στους ιστούς του, όπου συμβάλλουν στην προστασία από το οξειδωτικό στρες. Πέρα από την πρόδρομη δράση τους στη σύνθεση της βιταμίνης A, τα καροτενοειδή είναι ισχυροί εξουδετερωτές του μονήρους οξυγόνου και άλλων δραστικών μορφών του στοιχείου αυτού (ROS). Η ανεξέλεγκτη αύξηση ROS μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, βασικό παράγοντα πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, διάφορες μορφές καρκίνου, νευρολογικές διαταραχές και παθήσεις των ματιών. Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης τους στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι πλήρως κατανοητοί, λόγω της μεταβλητής βιοδιαθεσιμότητας και απορρόφησής τους, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψή τους μέσω της διατροφής ή συμπληρωμάτων μπορεί να έχει προστατευτικά οφέλη ενάντια σε σύγχρονες εκφυλιστικές ασθένειες (Fiedor & Burda, 2014).

Γλουταθειόνη (GSH)

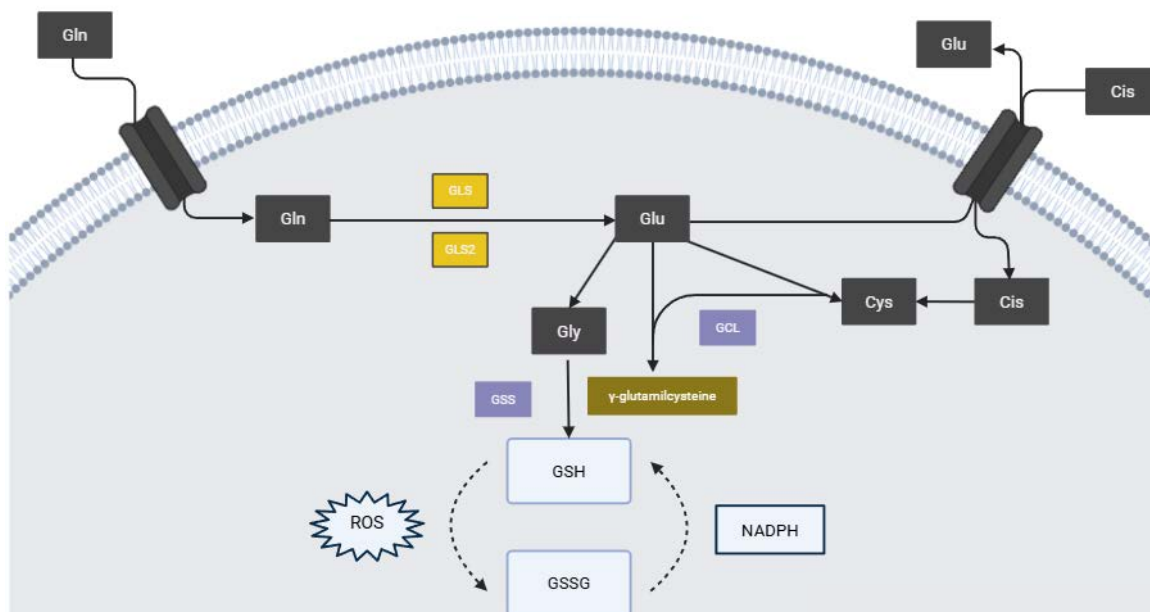
Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των θηλαστικών κυττάρων, και είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Averill-Bates, 2023). Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (Lapenna, 2023) και κατανέμεται στο

κυτταρόπλασμα (80-85%), στα μιτοχόνδρια (10-15%) και στο ΕΔ (Lu, 2013). Έχει την ικανότητα να δρα άμεσα ως αντιοξειδωτικό, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες και προοξειδωτικές ενώσεις, αλλά και έμμεσα ως συμπαραγοντας ενζύμων αποτοξίνωσης, όπως η περοξειδάση γλουταθειόνης (GPx), οι S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs) και οι γλυοξαλάσες. Μάλιστα, η GPx μπορεί να απομακρύνει οργανικά υπεροξείδια με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH σε GSSG (δισουλφίδιο γλουταθειόνης), η οποία αναγεννάται σε GSH με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και τη συνεισφορά του NADPH.

Η GSH, μεταξύ άλλων, παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση της βιταμίνης Ε μετά την εξουδετέρωση λιπιδικών ριζών (LOO·) από την τελευταία. Παράλληλα, συμμετέχει στην αντιμετώπιση και απομάκρυνση τοξικών αλδεϋδών όπως η μεθυλογλυοξάλη. Εξίσου σημαντική θεωρείται βέβαια και η ρυθμιστική της δράση στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς η GSH επιτελεί αναστρέψιμη S-γλουταθειονυλίωση κρίσιμων κυστεϊνικών υπολειμμάτων σε πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας την ενεργότητά τους σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Τέλος η GSH συμμετέχει σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η προστασία θειολικών ομάδων, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου όπως η απόπτωση και η φερρόπτωση (Averill-Bates, 2023).

Στο εσωτερικό υγιών κυττάρων περισσότερο από το 98% της γλουταθειόνης απαντάται σε ανηγμένη μορφή (GSH) ενώ το υπόλοιπο σε οξειδωμένη (GSSG). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η αναλογία μεταξύ των 2 μορφών είναι σταθερή. Ωστόσο όταν τα επίπεδα των ROS αυξάνονται και διαταράσσεται η κυτταρική ομοιόσταση, η αναλογία αλλάζει υπέρ της GSSG. Αυτό συμβαίνει επειδή η οξειδωμένη μορφή συσσωρεύεται ταχύτερα, ενώ η ανηγμένη καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό για να εξουδετερώσει το οξειδωτικό στρες.

Συνεπώς, η GSH αποτελεί πολυλειτουργικό μόριο κλειδί για την επιβίωση, προστασία και λειτουργικότητα του κυττάρου σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες με την αναλογία [GSH]/[GSSG] να συνιστά κρίσιμο δείκτη κυτταρικής οξειδωτικής ισορροπίας και συνολικής υγείας (Gaucher et al., 2018).



Εικόνα 10: Πορεία σύνθεσης γλουταθειόνης και μετατροπή της από ανηγμένη σε οξειδωμένη μορφή και αντίστροφα Created in BioRender.com (Matés et al., 2020)

Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη Ε (ή τοκοφερόλη) είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία και προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από οξειδωτική βλάβη. Ο οργανισμός δεν μπορεί να τη συνθέσει και επομένως απαιτείται η πρόσληψή της μέσω της διατροφής. Απαντάται κυρίως σε φυτά και φυτικά έλαια και από τις οκτώ φυσικές μορφές της (τέσσερις τοκοφερόλες και τέσσερις τοκοτριενόλες), η α-τοκοφερόλη είναι η πιο βιοδιαθέσιμη και επικρατέστερη στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η απορρόφηση και η μεταφορά της βιταμίνης Ε εξαρτώνται από την ακεραιότητα του μεταβολισμού των λιπών, ενώ η α-τοκοφερόλη μπορεί να μεταφερθεί στο ήπαρ και στη συνέχεια να διανεμηθεί στο πλάσμα. Η ανεπάρκειά της, αν και σπάνια, μπορεί να προκύψει σε παθήσεις που επηρεάζουν την απορρόφηση των λιπών, όπως η κυστική ίνωση, η χολόσταση ή η νόσος του Crohn, και σχετίζεται με νευρολογικές διαταραχές,

όπως αταξία και νευροπάθεια, αλλά και με αιμολυτική αναιμία λόγω μειωμένης σταθερότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Αν και η βιταμίνη Ε έχει μελετηθεί εκτενώς ως αντιοξειδωτικό προληπτικό μέσο έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου και εκφυλιστικών νόσων (όπως η νόσος Alzheimer), τα αποτελέσματα είναι συχνά αντικρουόμενα ή μη επαρκώς τεκμηριωμένα. Ενδεικτικά, σε κλινικές μελέτες, η χορήγηση υψηλών δόσεων α-τοκοφερόλης φάνηκε να βελτιώνει την πορεία της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, αλλά σχετίστηκε και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Συνεπώς, η χρήση της βιταμίνης Ε ως συμπλήρωμα διατροφής πρέπει να εξετάζεται με προσοχή, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα πιθανά οφέλη όσο και τους ενδεχόμενους κινδύνους (Medina & Gupta, 2025).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι μία υδατοδιαλυτή φυσική αντιοξειδωτική ένωση, γνωστή για την ικανότητά της να εξουδετερώνει τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), συμβάλλοντας έτσι στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και τις βλάβες στο DNA. Εξαιτίας της οξειδοαναγωγικής της ικανότητας βρίσκει εφαρμογή σε βιομηχανίες τροφίμων, προφυλάσσοντας τρόφιμα και βελτιώνοντας την ποιότητα τους (Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, 2003). Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως, αυτή μπορεί να εμφανίσει προοξειδωτική δράση, κυρίως μέσω αναγωγής μεταλλικών ιόντων όπως Fe^{3+} και Cu^{2+} που συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου.

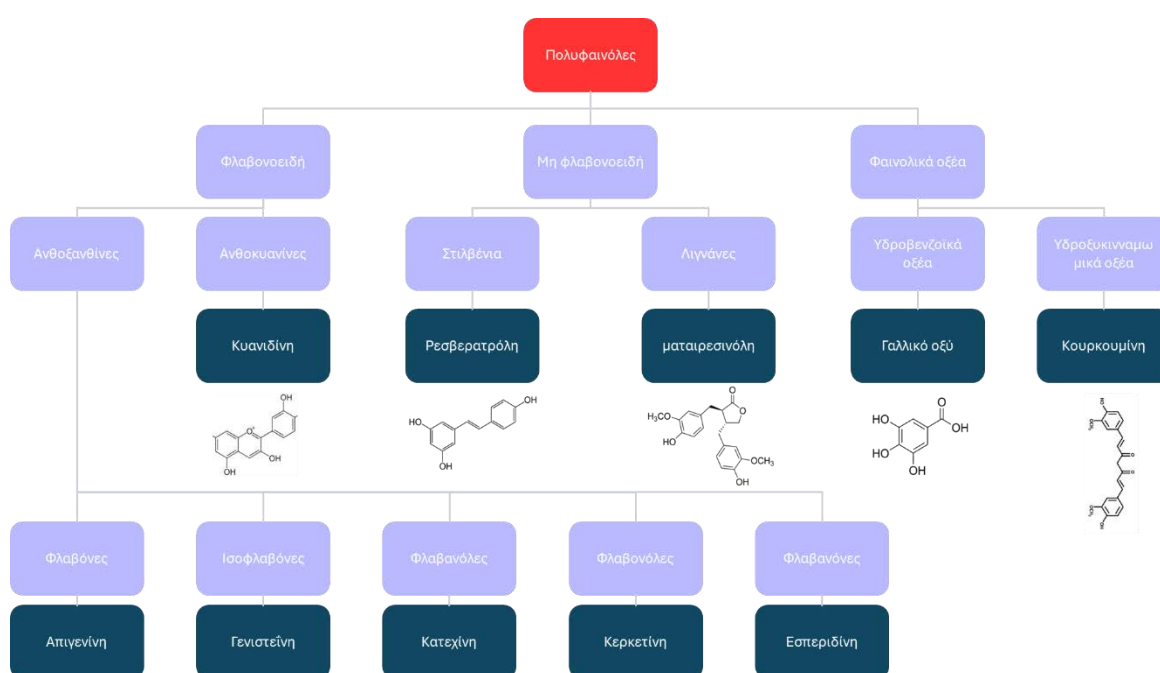
Η βιταμίνη C φαίνεται δηλαδή να λειτουργεί διττά: ως αντιοξειδωτικό σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, και ως προοξειδωτικό μέσο σε φαρμακολογικά επίπεδα. Παρά τα ενθαρρυντικά ευρήματα ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σε κυτταρικό και ζωικό επίπεδο, ώστε να τεκμηριωθεί ο μηχανισμός δράσης και η δυνητική κλινική της εφαρμογή ως αντικαρκινικό μέσο (Pizzino et al., 2017).

1.5 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι φυσικές ενώσεις που συντίθενται αποκλειστικά από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες και σχετίζονται με σημαντικές λειτουργίες του φυτού (Taiz et al., 2017). Χαρακτηρίζονται από φαινολική χημική δομή με ισχυρές

αντιοξειδωτικές ιδιότητες και απαντώνται σε φρούτα, λαχανικά, πράσινο τσάι, δημητριακά ολικής άλεσης κ.α. Φέρουν τουλάχιστον ένα φαινολικό δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Αυτή η περιγραφή καλύπτει έναν μεγάλο αριθμό ετερογενών ενώσεων ως προς την πολυπλοκότητά τους. Έτσι, οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε φλαβονοειδή, μη φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, ή να διαιρεθούν περαιτέρω σε πολλές υποκατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών ομάδων, τις ομάδες υποκατάστασης ή τον τύπο σύνδεσης μεταξύ των ομάδων αυτών (Singla et al., 2019).

1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών



Εικόνα 11: Ταξινόμηση πολυφαινολών (Maleki Dana et al., 2021)

Φλαβονοειδή:

Όλα τα φλαβονοειδή μοιράζονται τη βασική δομή του διφαινυλοπροπανίου (C6-C3-C6), στην οποία οι φαινολικοί δακτύλιοι (δακτύλιοι A και B) συνδέονται συνήθως με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο (C), ο οποίος είναι κατά βάση ένας κλειστός πυρανικός δακτύλιος. Η δομική ποικιλομορφία των φλαβονοειδών οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων. Έτσι, η κατηγορία ταξινομείται σε έξι επιμέρους υποτύπους, οι οποίοι είναι: οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες και οι φλαβανόνες. Οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες και οι φλαβανόλες

συνιστούν τις μεγαλύτερες υποκατηγορίες μεταξύ όλων των πολυφαινολών (Singla et al., 2019).

Μη φλαβονοειδή:

Διακρίνονται σε στιλβένια και λιγνάνες. Ο βασικός σκελετός των πρώτων αποτελείται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους ενωμένους μέσω μιας ακόρεστης γέφυρας δύο ατόμων άνθρακα (ένας διπλός δεσμός, C6-C2-C6). Τα στιλβένια απαντούν τόσο σε cis όσο και σε trans διαμόρφωση, με τη γλυκοσυλιωμένη μορφή να είναι επικρατέστερη. Οι λιγνάνες από την άλλη προέρχονται από συμπύκνωση δύο μονάδων φαινυλοπροπανίου, βρίσκονται συνήθως σε ελεύθερη μορφή, ενώ η γλυκοσυλιωμένη δομή τους είναι σπανιότερη (Singla et al., 2019).

Φαινολικά οξέα:

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα βενζοϊκού και κινναμικού οξέος (Pandey & Rizvi, 2009). Τα πρώτα περιέχουν μια καρβοξυλική ομάδα και η συγκέντρωσή τους σε φυτικά τρόφιμα είναι γενικά χαμηλή, ενώ τα δεύτερα φέρουν μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα συνδεδεμένη με βενζοϊκό δακτύλιο, στον οποίο τουλάχιστον ένα υδρογόνο αντικαθίσταται από μια υδροξυλομάδα (Iglesias-Carres et al., 2019). Τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν ποικιλία στη μοριακή δομή και βιολογική τους δράση, η οποία περιλαμβάνει αντιυπερτασικές, αντικαταθλιπτικές, νευροπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες (Tungmunhithum et al., 2018).

1.5.2 Πολυφαινόλες στερεών παραπροϊόντων ελιάς

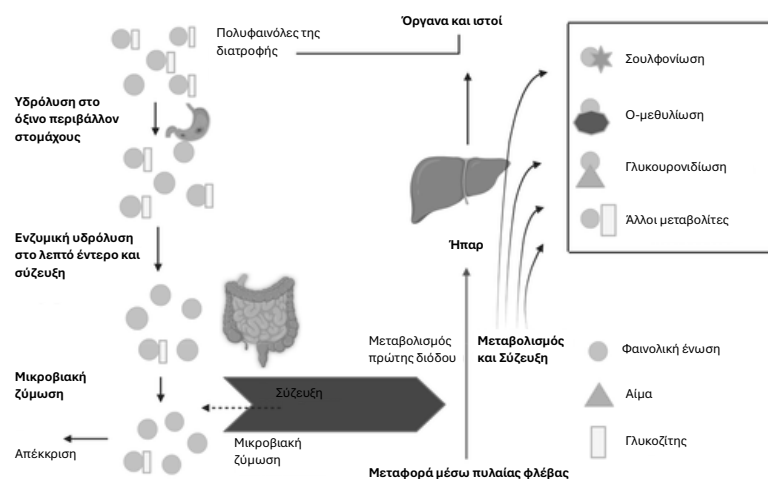
Η πολυφαινολική σύσταση των παραπροϊόντων ελιάς ποικίλλει και επηρεάζεται από παράγοντες όπως, η γεωγραφική προέλευση, οι αγροκλιματικές συνθήκες, ο βαθμός ωρίμανσης, η επεξεργασία του ελαιόκαρπου, η ποικιλία της ελιάς και οι συνθήκες αποθήκευσης της. Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας είναι οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών, οι οποίες καθορίζουν τόσο την ποσότητα όσο και τον τύπο των πολυφαινολών που περιέχονται στον ελαιόκαρπο και τα τελικά προϊόντα (Kouka et al., 2019). Από τις σημαντικότερες πολυφαινολικές ενώσεις της ελιάς με βιολογική και προστατευτική δράση είναι οι:

- Φλαβόνες (γλυκοσίδη, λουτεολίνη)
- Φλαβονόλες (ρουτίνη, κερκετίνη)
- Φλαβανόλες (κατεχίνη)
- Απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη)
- Φαινολικά οξέα (βερμπασκοσίδη, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ)
- Σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπαϊνή, λιγκστροσίδη)

(Khwaldia et al., 2022)

1.5.3 Βιοδιαθεσιμότητα βιοφαινολικών ενώσεων

Οι πολυφαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών από βιοτικούς (παράσιτα) και αβιοτικούς παράγοντες (UV ακτινοβολία, ελεύθερες ρίζες). Στον άνθρωπο, η διατροφική τους αξία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, δηλαδή την ικανότητά τους να απορροφώνται και να φτάνουν σε ενεργή μορφή στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας. Παράγοντες όπως η χημική δομή, ο βαθμός πολυμερισμού, το μέγεθος μορίου, η διαλυτότητα, αλλά και η σύνδεση με άλλες ενώσεις, μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Μόνο το 5–10% αυτών φαίνεται να μπορεί να απορροφηθεί στο λεπτό έντερο, ενώ οι πιο σύνθετες μορφές τους όπως οι ταννίνες φτάνουν στο παχύ έντερο, όπου και διασπώνται από τη μικροχλωρίδα σε μικρότερα μόρια προκειμένου να καταστούν βιοδιαθέσιμες. Η εντερική μικροχλωρίδα παίζει λοιπόν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία απορρόφησης τους. Για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών έχει βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνολογικές ή χημικές μέθοδοι, όπως η χρήση προφαρμάκων, πολυμερών (κυκλοδεξτρίνες, κιτοζάνη) ή νανοτεχνολογίας, ώστε να ενισχυθεί η απορρόφηση, η διαλυτότητα και τέλος ο μεταβολισμός τους (Rana et al., 2022).



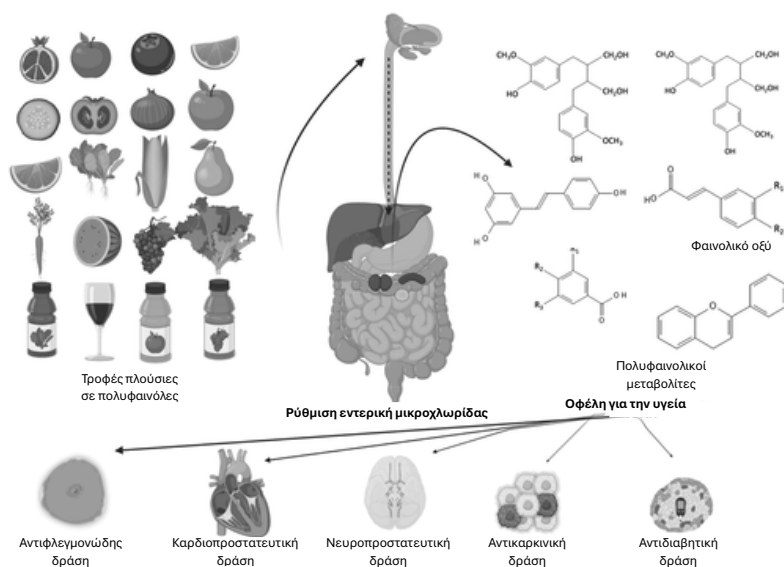
Εικόνα 12: Μεταβολική οδός φαινολών στον άνθρωπο (Rana et al., 2022)

1.5.4 Θετικές επιδράσεις πολυφαινολών

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις πολυφαινόλες λόγω των διαφόρων πιθανών ευεργετικών επιδράσεών τους για την υγεία στον άνθρωπο, όπως είναι οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Zhang et al., 2022).

Οι πονυφαινόλες, και κυρίως τα φλαβονοειδή, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ένζυμα φλεγμονής όπως η φωσφολιπάση A2 (PLA2), η λιποξυγενάση (LOX) και οι κυκλοξυγενάσες COX-1 και COX-2, συμβάλλοντας στη μείωση της παραγωγής προσταγλανδινών και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της φλεγμονής σε ιστούς. Επιπλέον, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων και την ενζυμική δραστηριότητα, να αναστείλλουν την κυτταρική πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, να συμβάλλουν στη μείωση της αγγειογένεσης, και να παρεμποδίσουν τη μετακίνηση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, ασκώντας έτσι αντικαρκινική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων βασίζεται στη ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, να χηλικοποιούν μεταλλικά ιόντα (π.χ. Fe^{2+} , Cu^{2+}), μειώνοντας τη δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου, και να προστατεύουν βασικά κυτταρικά συστατικά (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA) από το οξειδωτικό στρες. Οι δράσεις τους αυτές μπορούν να καθορίσουν χρόνιες παθήσεις, καθώς η μακροχρόνια κατανάλωση πολυφαινολών φαίνεται να προστατεύει από καρδιαγγειακές νόσους, διαβήτη τύπου II,

οστεοπόρωση, μορφές καρκίνου, γαστρεντερικές και παγκρεατικές παθήσεις, και νευροεκφυλιστικές νόσους (π.χ. Alzheimer). Επιπρόσθετα, η ανοσορρυθμιστική δράση τους εκδηλώνεται από την ικανότητά τους να διεγείρουν την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), που μπορεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και να συμβάλλει στην ανοσολογική απόκριση. Τέλος, άλλα οφέλη που σχετίζονται με αυτές, περιλαμβάνουν την προστασία δέρματος από υπεριώδη ακτινοβολία, αντικρκινικές ιδιότητες, και ρύθμιση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας, γεγονός που αποτρέπει από φαινόμενα παχυσαρκίας, καθώς οι πολυφαινόλες λειτουργούν συμπληρωματικά με τα πρεβιοτικά και προβιοτικά για την υγεία του εντέρου (μεταβολισμός πολυφαινολών από εντερικό μικροβίωμα και επακόλουθη ρύθμιση μικροβιώματος από αυτές) (Rana et al., 2022).



Εικόνα 13: Ο ρόλος των πολυφαινολών της τροφής (Rana et al., 2022)

1.5.5 Δυνητικά αρνητικές επιπτώσεις φαινολών

Οι πολυφαινόλες, αν και είναι γνωστές για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να επιδείξουν και προοξειδωτική δράση. Αυτή η δράση εμφανίζεται κυρίως παρουσία μεταλλικών ιόντων, οξυγόνου, καθώς και σε αλκαλικό pH. Στις συνθήκες αυτές, οι πολυφαινόλες σχηματίζουν φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες αντιδρούν με το οξυγόνο, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 . Οι παραγόμενες ROS είναι ιδιαίτερα δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες των βιομορίων. Ορισμένες πολυφαινόλες, όπως το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες στην οξείδωση παρουσία

χαλκού, προκαλώντας έντονες βλάβες στο γενετικό υλικό. Ωστόσο, παρόλο που η προοξειδωτική δράση μπορεί να είναι επιζήμια για τα φυσιολογικά κύτταρα, ενδέχεται να υπάρχει όφελος στην αντικαρκινική θεραπεία, δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα περιέχουν υψηλότερα επίπεδα χαλκού από τα φυσιολογικά. Έτσι, η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυννητικά για την πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα.

Πέρα από τα παραπάνω, οι πολυφαινόλες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα και με πρωτεΐνες, επηρεάζοντας σημαντικά τη δομή, τη λειτουργία, τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα τους. Στην περίπτωση ενζύμων, η δέσμευση μπορεί να επιφέρει μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας και, κατά συνέπεια, διαταραχές σε πεπτικές και μεταβολικές διεργασίες, όπως είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές και η μειωμένη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Συμπερασματικά, ο ρόλος των πολυφαινολών αν και ποικίλλει χρήζει περαιτέρω έρευνας προς αποφυγήν των δυσμενών επιδράσεών τους (Duda-Chodak & Tarko, 2023).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραπροϊόντος ελαιουργίας, με συνδυασμό τεχνικών σε cell-free και cell-based συστήματα. Αναλυτικά, πραγματοποιείται αξιολόγηση της ικανότητας του δείγματος να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες (DPPH, ABTS, Superoxide, ORAC, Plasmid DNA relaxation assay), έλεγχος της αναγωγικής ικανότητας (Reducing power assay, CUPRAC assay), και προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (Folin-Ciocalteu). Επιπλέον, γίνεται έλεγχος της επίδρασης του δείγματος σε ηπατικά κύτταρα HepG2 μέσω εκτίμησης των ενδογενών επιπέδων GSH και ROS (κυτταρομετρία ροής), και των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) έπειτα από επαγωγή οξειδωτικού στρες (H_2O_2), με στόχο την ανάδειξη της ενδεχόμενης αξιοποίησης ανάλογων παραπροϊόντων ως φυσικών αντιοξειδωτικών με φαρμακολογικό, βιοτεχνολογικό ή διατροφικό ενδιαφέρον.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εισαγωγή

Η ολιστική αξιολόγηση της δράσης φυτικών παραπροϊόντων γίνεται ακολουθώντας μια προσέγγιση πολλαπλών επιπέδων. Σε πρώτη φάση, πραγματοποιείται προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής, αντιγενotoξικής και αναγωγικής ικανότητας του δείγματος με μεθόδους που βασίζονται στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και παρέχουν ένδειξη βιοδραστικότητας, επιτρέποντας τη σύγκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων. Σε δεύτερη φάση, το δείγμα αξιολογείται σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών, ώστε να εξεταστεί η κυτταροτοξικότητα, καθώς και η αντιοξειδωτική του δράση. Αν και οι κυτταρικές σειρές θεωρούνται *in vitro* μοντέλα, η μεταβολική τους δραστηριότητα τις καθιστά κατάλληλες για *in vivo*-like αξιολογήσεις, λειτουργώντας ως μεταβατικό βήμα προς πιο σύνθετα *in vivo* μοντέλα. Σε τρίτη φάση διενεργούνται πειράματα σε πειραματόζωα και ανθρώπους. Βάσει αυτών, η παρούσα πτυχιακή αναλύει τη δυναμική δείγματος παραπροϊόντος ελαιουργίας στηριζόμενη στα δύο πρώτα επίπεδα ανάλυσης.

3.2 Εξεταζόμενο δείγμα

Το υπό μελέτη δείγμα αποτελούνταν από στερεό, επεξεργασμένο παραπροϊόν το οποίο προέκυψε από την επεξεργασία του ελαιόκαρπου για την παραγωγή ελαιόλαδου. Για τη χρήση του δείγματος στις μεθόδους παρασκευάστηκε διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας 50 mg/ml.

3.3 Χημικά αντιδραστήρια

Folin-Ciocalteu (Merck), Na_2CO_3 (Sigma), γαλλικό οξύ (Alpha-aesar), DPPH (Sigma), ασκορβικό οξύ (Alpha-aesar), ABTS (Alpha-aesar), H_2O_2 (Sigma), HRP (Sigma), potassium ferricyanide (Alpha-aesar), ferric chloride (Sigma), TCA (Serva), CuCl_2 (Sigma), ammonium acetate (Sigma), Nc (Sigma), αιθανόλη (Merck), AAPH (Sigma), βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma), αγαρόζη (Serva), Tris (Serva), βορικό οξύ (Alpha-aesar), NBT (Serva), NADH (Serva), PMS (Serva), KH_2PO_4 (Serva), K_2HPO_4 (Serva), 2,7-dichlorofluoroscein (Sigma), Trolox (Alpha-aesar), quercetin (Alpha-aesar), DMEM high glucose (Thermo-scientific), FBS 10% v/v (Thermo-scientific), L-γλουταμίνη 2mM (Thermo-scientific), αντιβιοτικά πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη 1v/v(Thermo-scientific),

PBS(Thermo-scientific), τρυψίνη(Thermo-scientific), XTT reagent (Thermo-scientific), χρωστική Thiol green (Thermo-scientific), χρωστική DCF-DA (Sigma), μεθανόλη (Merck), dH₂O, αλβουμίνη (Thermo-scientific), αναστολείς πρωτεασών (Thermo-scientific), Na₂SO₄ (Serva),TBA (Serva).

3.4 In vitro τεχνικές (cell-free assays)

3.4.1 Προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε μέσω χρωματομετρικής μεθόδου που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC). Το FC είναι μείγμα σύνθετων πολυμερών ιόντων από φωσφοβολφραμικά και φωσφομολυβδαινικά ετεροπολυμερή οξέα και διακρίνεται για την ικανότητα του να οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα, ανάγοντας συγχρόνως τα ετεροπολυμερή οξέα. Αυτό που προκύπτει είναι ένα μπλε σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου που απορροφά στο ορατό φάσμα, σε μήκος κύματος 765nm, με την ένταση του χρώματος να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης φαινολών στο δείγμα. Το αλκαλικό pH του διαλύματος ρυθμίζεται παρουσία κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου και αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία φαινολικών ιόντων, ενώ δε διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης.

Πειραματική διαδικασία

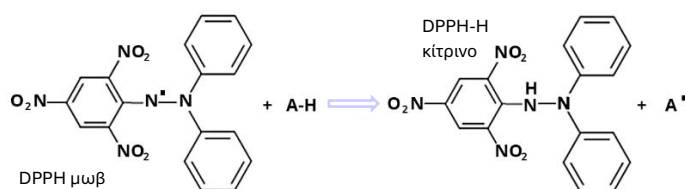
Αφού προετοιμάστηκαν τα αντιδραστήρια και οι αραιώσεις του δείγματος σε dH₂O, πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

Σε πλαστικά σωληνάκια erpendorf χωρητικότητας 2ml προστέθηκαν 1000μl dH₂O, 100μl αντιδραστήριο FC και 20μl δείγματος. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 280μl διαλύματος Na₂CO₃ 25% w/v, και 600μl dH₂O. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για μια ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομέτρηση στα 765nm. Παρασκευάστηκαν επίσης τυφλά δείγματα (1020μl dH₂O) και δείγματα αρνητικού μάρτυρα (1100μl dH₂O), απουσία του αντιδραστηρίου FC, για τον έλεγχο της απορρόφησης αυτούσιας της εξεταζόμενης ουσίας. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε για δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις, και τα δείγματα

παρασκευάστηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg GAE/ g δείγματος.

3.4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH·

Η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση της τεχνητής ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH·) που προσδίδει μωβ χρώμα στο διάλυμα και φωτομετράται στα 517nm. Η προσθήκη στο διάλυμα, ουσίας με αντιοξειδωτική δράση οδηγεί σε αναγωγή της ρίζας μέσω πρόσληψης ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου. Το προϊόν που προκύπτει είναι η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, η οποία προσδίδει κίτρινο χρώμα και μειώνει την τιμή της απορρόφησης στα 517nm.



Εικόνα 14: Αντίδραση αναγωγής DPPH·.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια erpendorfs των 1,5ml προστέθηκαν 50μl δείγματος διαφορετικών αραιώσεων, 900μl μεθανόλης και 50μl διαλύματος DPPH· (2mM), με τον τελικό όγκο της αντίδρασης να ανέρχεται στο 1ml. Το περιεχόμενο των erpendorfs αναδεύτηκε με vortex και επωάστηκε για 20' στο σκοτάδι σε RT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε συνθήκες 3000rpm, 3', RT και φωτομέτρηση στα 517nm με το φωτόμετρο να μηδενίζεται μόνο με μεθανόλη (τυφλό) (1000μl). Παράλληλα, με κάθε αραιώση του δείγματος φωτομετρήθηκε και αρνητικός μάρτυρας που δεν περιείχε τη ρίζα (50μl δείγμα + 950μl μεθανόλη), προκειμένου να γίνει έλεγχος απορρόφησης της ουσίας, ενώ για τον έλεγχο της μεθόδου φωτομετρήθηκε θετικός μάρτυρας που δεν περιείχε δείγμα (50μl DPPH· + 950μl μεθανόλη). Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά 2 φορές και κάθε αραιώση μετρήθηκε εις διπλούν. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ (0,4 mg/ml), προκειμένου να ελεγχθεί η εγκυρότητα της μεθόδου και να είναι εφικτή η σύγκριση της δραστηριότητας του προς ανάλυση δείγματος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίσθηκε μέσω του τύπου:

% εξουδετέρωση της ρίζας= [(απορρόφηση μάρτυρα-απορρόφηση ουσίας)/
απορρόφηση μάρτυρα] * 100

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη μορφή IC50 (mg/ml) (= η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%), με χαμηλές τιμές να υποδηλώνουν υψηλή δραστηριότητα.

3.4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS^{•+}

Η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση της τεχνητής ρίζας ABTS^{•+}, που προσδίδει πράσινο χρώμα στο διάλυμα και φωτομετράται στα 730nm. Η ρίζα αυτή παράγεται μέσω οξείδωσης του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) από περοξειδάσες (HRP) παρουσία H₂O₂. Η προσθήκη στο διάλυμα ουσιών με αντιοξειδωτική δράση οδηγεί σε αποχρωματισμό και μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730nm, καθώς η ρίζα ανάγεται με προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου.

Πειραματική διαδικασία

Αφού προετοιμάστηκαν οι αραιώσεις του δείγματος, σε eppendorfs των 1.5ml, προστέθηκαν 400μl dH₂O, 500μl διαλύματος ABTS (1mM), 50μl H₂O₂ (30μM) και 50μl HRP. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση για 45, σε RT και περιβάλλον συσκότισης και έπειτα ανάμειξη με 50μl δείγματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το περιεχόμενο φυγοκεντρήθηκε για 3' σε 3000rpm και RT, και φωτομετρήθηκε στα 730nm, με την κάθε αραιώση να ελέγχεται 2 φορές ανά επανάληψη πειράματος. Ο αρνητικός μάρτυρας (450μl dH₂O, 500μl ABTS, 50μl H₂O₂ και 50μl δείγματος) δημιουργήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η τυχόν απορρόφηση μόνο του δείγματος στα συγκεκριμένα nm, ο θετικός (400μl dH₂O, 500μl ABTS, 50μl H₂O₂ και 50μl HRP) προκειμένου να γίνει έλεγχος της λειτουργικότητας των αντιδραστηρίων και το τυφλό (450μl dH₂O, 500μl ABTS και 50μl H₂O₂) προκειμένου να μηδενισθεί το φωτόμετρο. Ταυτόχρονα με το δείγμα και για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο το ασκορβικό οξύ (0,4 mg/ml). Η εξίσωση

% εξουδετέρωση της κατιονικής ρίζας= [(απορρόφηση μάρτυρα- απορρόφηση ουσίας)/
απορρόφηση μάρτυρα] * 100 χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιορισθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία και εκφράστηκε με τη μορφή IC50

(mg/ml) (= η συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται για εξουδετέρωση του 50% της ρίζας).

3.4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να ανάγει τον τρισθενή σε δισθενή σίδηρο (Reducing Power)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγική δύναμη, την ικανότητα δηλαδή που έχουν ορισμένες ενώσεις να παρέχουν ηλεκτρόνια. Οι ενώσεις αυτές μεταξύ άλλων μπορούν και ανάγουν τον τρισθενή Fe^{+3} σε δισθενή Fe^{+2} σίδηρο, ο οποίος όταν αντιδρά με FeCl_2 , σχηματίζει σύμπλοκο που απορροφά στα 700nm. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της απορρόφησης τόσο μεγαλύτερη η αναγωγική ισχύς της προς εξέταση ουσίας. Η αναγωγική ισχύς συνδέεται άρρηκτα με πράσινες και μπλε αποχρώσεις που παίρνει το αρχικώς κίτρινης απόχρωσης διάλυμα.

Πειραματική διαδικασία

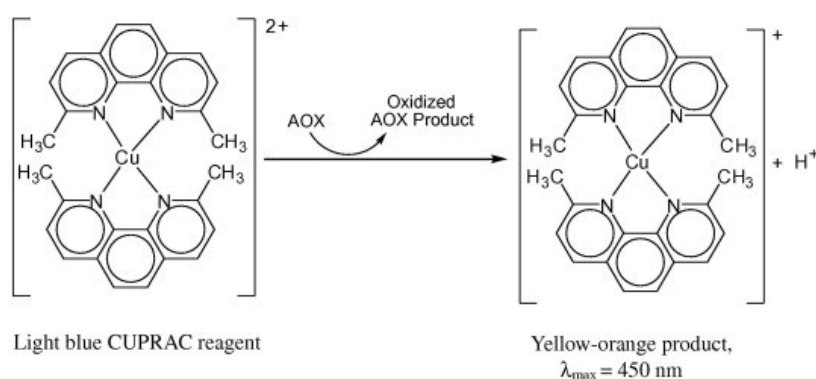
Έγινε ανάμειξη 50μl δείγματος με 200μl phosphate buffer (0.2M) (pH= 6.6) και 250μl potassium ferricyanide 1% w/v. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε, επωάστηκε στους 50°C για 20' και επαναδιαλύθηκε σε 250μl TCA 10% w/v. Έπειτα ανακινήθηκε, φυγοκεντρήθηκε για 10' σε 3000rpm, αραιώθηκε με προσθήκη 250μl dH_2O και προστέθηκαν 50μl ferric chloride 0.1% w/v και επωάστηκε στο σκοτάδι για 10. Τελικά οι αραιώσεις φωτομετρήθηκαν στα 700nm, με όλες τις αρχικές αναμείξεις να γίνονται σε erpendorfs των 1.5ml και τη φυγοκέντρωση να ακολουθεί μεταφορά 700μl υπερκειμένου σε άδεια/ καθαρά tubes. Ο θετικός μάρτυρας περιείχε 250μl phosphate buffer, 250μl potassium ferricyanide, 250μl TCA, 250μl dH_2O και 50μl ferric chloride, ο αρνητικός 50μl δείγματος, 450μl phosphate buffer, 250μl TCA, 250μl dH_2O και 50μl ferric chloride και το τυφλό 500μl phosphate buffer, 250μl TCA, 250μl dH_2O και 50μl ferric chloride. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και κάθε αραιώση φωτομετρήθηκε εις διπλούν ανά επανάληψη πειράματος. Η βιταμίνη C (0,4 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο και οι υπολογισμοί έγιναν με την εξίσωση:

$\text{AU } 0.5 \text{ (mg/ml)} = \text{απορρόφηση ουσίας} - \text{απορρόφηση μάρτυρα}$

με AU 0.5 (= absorbance unit) να εκφράζει τη συγκέντρωση του δείγματος στην οποία παρατηρείται απορρόφηση 0.5.

3.4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να ανάγει τον δισθενή σε μονοσθενή χαλκό (CUPRAC)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγική δύναμη, την ικανότητα δηλαδή που έχουν ορισμένες ενώσεις να παρέχουν ηλεκτρόνια, ανάγοντας τα προϊόντα οξείδωσης των ελευθέρων ριζών. Αναλυτικά, η μέθοδος μπορεί να προσδιορίζει την αντιοξειδωτική δράση βιολογικών υγρών, τροφίμων και φυτικών εκχυλισμάτων μέσω εκτίμησης της ικανότητας τους να ανάγουν τον δισθενή (Cu^{+2}) σε μονοσθενή (Cu^{+1}) χαλκό, παρουσία ενός χηλικού παράγοντα, όπως είναι η νεοκουπροΐνη. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι έγχρωμο και απορροφά στα 450nm, με την ένταση του χρώματος να σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα του δείγματος να δρα ως δότης ηλεκτρονίων.



Εικόνα 15: Μηχανισμός αντίδρασης δοκιμής CUPRAC (Özyürek et al., 2011)

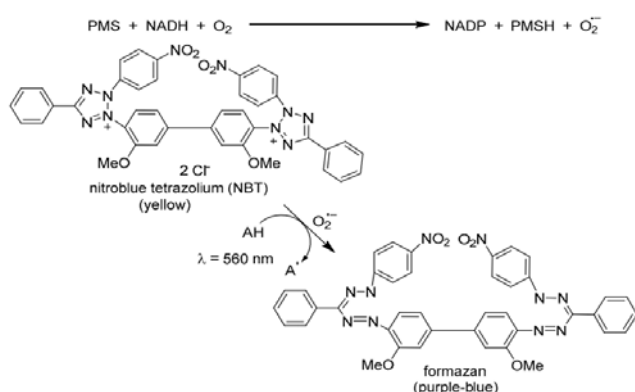
Πειραματική διαδικασία

Σε tubes των 1.5ml έγινε προσθήκη 250μl $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10^{-2}M), προσθήκη 250μl Nc ($7.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$), προσθήκη 250μl NH_4Ac (1M) (pH=7), προσθήκη 50μl δείγματος, και προσθήκη 225μl dH_2O . Ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση για 30' και φωτομέτρηση στα 450nm. Από το θετικό μάρτυρα απουσίαζε το δείγμα, με το dH_2O να ανέρχεται στα 275μl, από τον αρνητικό η Nc και το dH_2O , ενώ από το τυφλό η Nc και το δείγμα, με το dH_2O να ανέρχεται στα 525μl. Το ασκορβικό οξύ (0,4 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο, το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και οι μετρήσεις για κάθε αραιώση ήταν 4 (2 ανά επανάληψη). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκφράστηκαν ως αναγωγική ικανότητα του εξεταζόμενου δείγματος, δηλαδή ως

AU 0.5 (mg/ml)= απορρόφηση ουσίας – απορρόφηση μάρτυρα, με AU 0.5 (= absorbance unit) να υποδηλώνει τη συγκέντρωση του δείγματος που απαιτείται για οπτική απορρόφηση 0.5.

3.4.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ (Superoxide)

Η ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου έχει συσχετιστεί με την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, την αδρανοποίηση ενζύμων και την καταστροφή κυτταρικών συστατικών ενώ φαίνεται να εμπλέκεται στην υπεροξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων και ενδεχομένως άλλων ευαίσθητων μορίων. Στη μέθοδο αυτή, η ρίζα σχηματίζεται από το σύστημα PMS-NADH, μέσω οξείδωσης του NADH και ανάγει το NBT σε φορμαζίνη. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 560nm και ευθύνεται για το μπλε χρώμα του διαλύματος. Αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να μπλοκάρουν τη μετατροπή του αρχικώς κίτρινου NBT^{2+} , μειώνοντας έτσι την οπτική απορρόφηση στα 560nm.



Εικόνα 16: Μηχανισμός της μεθόδου Superoxide

Πειραματική διαδικασία

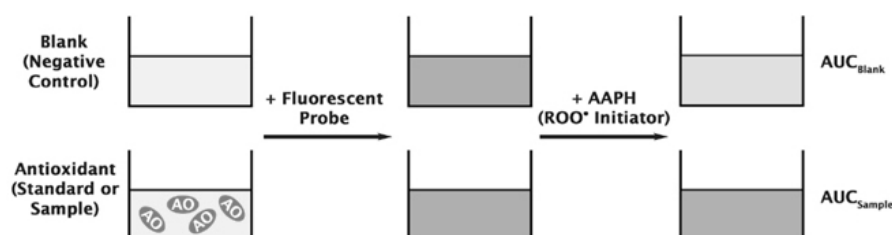
Σε tubes των 1.5ml έγινε προσθήκη 50μl δείγματος, 625μl Tris-HCl (16mM) (pH=8.0), 125μl NBT (300μM), 125μl NADH (468μM), και 125μl PMS (60μM). Ακολούθησε επώαση για 5', στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση σε συνθήκες 3000rpm, 3', RT. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560nm και ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γαλλικού οξέος (1mg/ml). Το τυφλό περιείχε 800μl Tris-HCl, 125μl NBT και 125μl NADH, ο θετικός μάρτυρας 50μl dH₂O αντί για δείγμα, και ο αρνητικός 50μl δείγματος,

750μl Tris-HCl, 125μl NBT και 125μl NADH. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 ανεξάρτητες φορές (παρασκευή αραιώσεων x2 για κάθε επανάληψη). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη μορφή

IC₅₀ (mg/ml) (= η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί εξουδετέρωση της ρίζας κατά 50%) και προσδιορίστηκαν μέσω της εξίσωσης $\%RSC = [(Abs_{\text{μάρτυρα}} - Abs_{\text{ουσία}}) / Abs_{\text{μάρτυρα}}] * 100$

3.4.7 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας του δείγματος να καθυστερεί την οξείδωση της φλουορεσκεΐνης (ORAC)

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου έχουν την ικανότητα να επάγουν την οξείδωση της φλουορεσκεΐνης, που είναι ένωση με ιδιαίτερα έντονη φθορίζουσα ιδιότητα. Το οξειδωμένο προϊόν, έχει ασθενή φθορισμό και η προσθήκη στο διάλυμα αντιοξειδωτικών ουσιών επιβραδύνει την επαγόμενη από ρίζες μείωση της απορρόφησης, μέσω εξουδετέρωσης τους. Στη μέθοδο ως πηγή ριζών περοξυλίου, χρησιμοποιείται η AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), η οποία σε υδατικά διαλύματα και υπό θερμοκρασία 37°C αποσυντίθεται σταδιακά. Η βαθμονόμηση του συστήματος και η ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια του Trolox (συνθετικό ανάλογο βιταμίνης E), του οποίου η αντιοξειδωτική δράση είναι γνωστή. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμο Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και υπολογίζονται μέσω της πρότυπης καμπύλης αυτού.

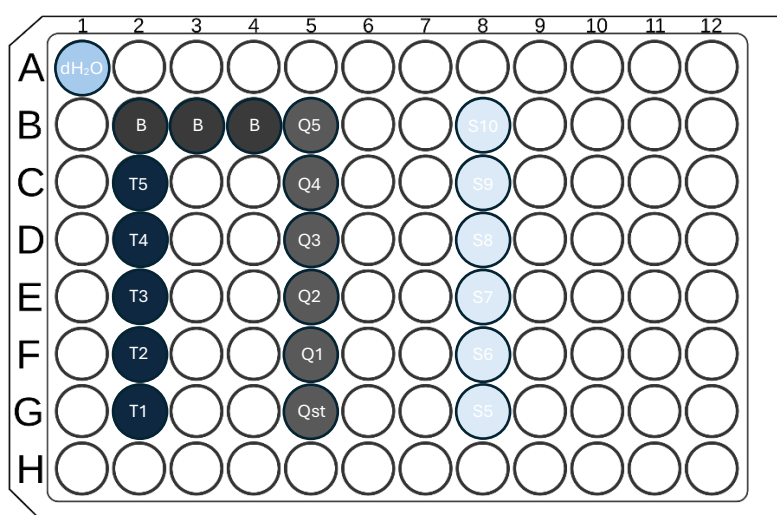


Εικόνα 17: Δράση δείγματος με αντιοξειδωτική ικανότητα (Sridevi, et al, 2018)

Πειραματική διαδικασία

Το δείγμα διαλύθηκε σε διάλυμα ακετόνης-νερού 50:50 v/v και αναδεύτηκε για μια ώρα υπό χαμηλή ένταση σε συσκευή shaker. Ακολούθως έγινε φυγοκέντρηση (10000rpm, 15', RT) και το ίζημα απορρίφθηκε. Τα απαραίτητα διαλύματα

παρασκευάστηκαν και οι αραιώσεις εκχυλίσματος, Trolox και κερκετίνης (0,03mg/ml) έγιναν σε ORAC working buffer. Σε μικροπλάκες 96 κυψελών (96-well plate) προστέθηκαν περιμετρικά 150μl νερού ανά πηγαδάκι και στο κέντρο με τη σειρά 150μl διαλύματος Fluorescein working solution ($11.12 \cdot 10^{-2}$ M) , 25μl διαλύματος ORAC working buffer (διάλυμα KH_2PO_4 , K_2HPO_4) (75mM) στο τυφλό (B) και 25μl διαλύματος Trolox working standard (T) (100μM)/ 25μl quercetin (Q) (0.3mg/ml) / 25μl εξεταζόμενου δείγματος (S) στα υπόλοιπα πηγαδάκια. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε με πολυκάναλη πιπέτα και επωάστηκε για μισή ώρα στους 37°C. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος AAPH (156.66μM) (25μl) σε όλα τα πηγαδάκια. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε και πάλι με όμοιο τρόπο και μετρήθηκε σε συσκευή plate-reader [(διάρκεια μέτρησης 1.5h, μετρήσεις ανά 5min στους 37°C), (μήκος κύματος διέγερσης: $485 \pm 20\text{nm}$, μήκος κύματος εκπομπής: $530 \pm 25\text{nm}$)].



Εικόνα 18: Απεικόνιση της κατανομής ουσιών σε 96-well plate: x3 Blank, x3 Trolox, x3 Quercetin, x4 Sample

Το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν. Η κερκετίνη (0.03mg/ml) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο δείγμα και η αντιοξειδωτική/ προστατευτική δράση του δείγματος υπολογίσθηκε μέσω της σύγκρισης της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) για το εξεταζόμενο δείγμα, και της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) για το Blank (0μl δείγματος). Το διάλυμα Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, και η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος εκφράστηκε ως συνάρτηση Trolox Equivalents. Για τον

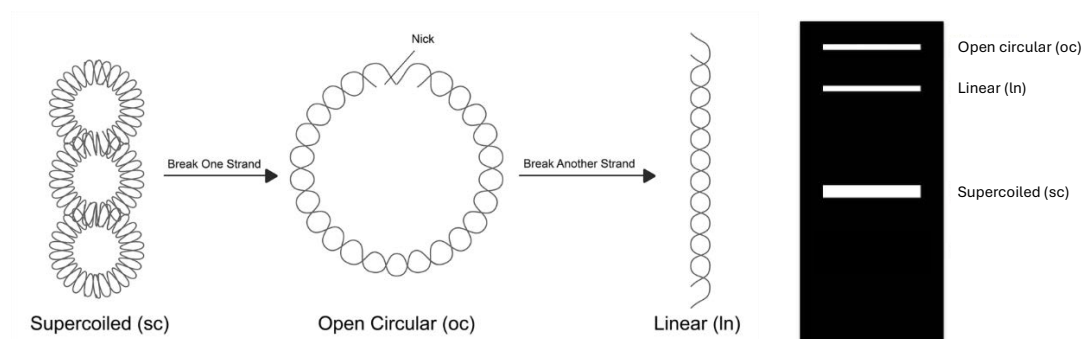
υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν η κλίση της καμπύλης του δείγματος που προέκυψε, και της καμπύλης του Trolox , και ο τύπος:

$TE = \text{slope regression curve (δείγματος)} / \text{slope regression curve (Trolox)} \rightarrow TE = b_{\text{δείγματος}}(\text{Net AUC/mg/ml}) / b_{\text{Trolox}}(\text{Net AUC/}\mu\text{M})$ ως $\mu\text{mol TE} / \text{g δείγματος}$.

3.4.8 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου ($\text{ROO}^\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Η αντιοξειδωτική/ αντιγεντοξική δράση του δείγματος αποτιμήθηκε επιπροσθέτως μέσω της ικανότητάς του να προστατεύει το πλασμιδιακό DNA από επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες ρήξη σε ένα μόλις κλώνο. Το πλασμίδιο είναι DNA, δίκλωνο κυκλικό, μικρού μεγέθους, απαντάται κυρίως σε βακτήρια και απομονώνεται εύκολα. Οι διαφορετικές διαμορφώσεις που παίρνει ανάλογα με το βαθμό υπερελίκωσης το καθιστούν πολύτιμο εργαλείο, με βιοτεχνολογική σημασία. Αυτές διακρίνονται σε:

- Υπερελικωμένη
- Κυκλική ανοικτή
- Γραμμική



Εικόνα 19: Μορφές πλασμιδιακού DNA και κινητικότητα σε gel αгарόζης

και παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, εξαιτίας του διαφορετικού τους μεγέθους.

Πειραματική διαδικασία

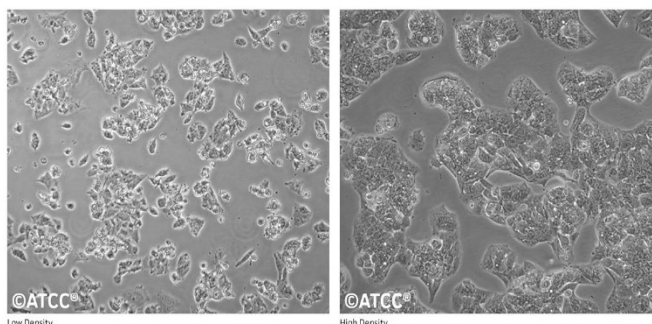
Σε πηκτή αγαρόζης 0.8% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου που επιτρέπει την οπτική ανίχνευση του DNA, προστέθηκαν με τη σειρά 1μl PBS, 3μl δείγματος, 2μl DNA (3,2μg) και 4μl διαλύματος AAPH. Το περιεχόμενο σε eppendorfs των 0.5ml αναδεύτηκε με

spin, επωάστηκε για 45' στους 37°C, αναμείχθηκε με 3μl loading buffer με στόχο την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης και της διακοπής της αντίδρασης, και ηλεκτροφορήθηκε για 65', στα 70V σε πήκτωμα αγαρόζης. Το αποτέλεσμα φωτογραφήθηκε έπειτα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ποσοτικοποιήθηκε και εκφράστηκε με τη μορφή IC50 (mg/ml) (= η συγκέντρωση που αναστέλλει κατά 50% τη μετάβαση του πλασμιδίου από την υπερελικωμένη στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση). Ταυτόχρονα, παρασκευάστηκαν θετικός και αρνητικός μάρτυρας, απουσία δείγματος (4μl PBS), και δείγματος και AAPH (8μl PBS) αντίστοιχα, προκειμένου να γίνει έλεγχος της λειτουργικότητας της μεθόδου και προσδιορισμός της ζώνης του υπερελικωμένου DNA. Η μέγιστη συγκέντρωση του δείγματος εξετάστηκε επίσης απουσία διαλύματος AAPH (5μl PBS, 3μl δείγμα, 2μl DNA) προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση αυτούσιου του δείγματος στο πλασμιδιακό DNA. Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο δείγμα. Το πείραμα επαναλήφθηκε για τουλάχιστον 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις με την κάθε αραιώση να ηλεκτροφορείται συνολικά 4 φορές.

3.5 Κυτταροκαλλιέργειες (cell-based assays)

3.5.1 Κυτταρική σειρά HepG2

Τα κύτταρα HepG2, όπως έχουν καταχωρηθεί στην κυτταρική τράπεζα ATCC, είναι μια ανθρώπινη αθανатоποιημένη καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από ηπατικό ιστό ατόμου με διαφοροποιημένο



Εικόνα 20: Κύτταρα **HepG2** σε χαμηλή και υψηλή πυκνότητα. (Hep G2 [HEPG2], n.d.) (ATCC)

ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Νεότερες γενετικές αναλύσεις βέβαια υποστηρίζουν ότι η προέλευση τους είναι από ηπατοβλάστωμα (Arzumanian et al., 2021). Η κυτταρική σειρά HepG2, χρησιμοποιείται σε in vitro ερευνητικά πειράματα, για μεταβολικές μελέτες, μελέτες τοξικότητας ξеноβιοτικών και δοκιμές αντιοξειδωτικής ή φαρμακευτικής δράσης. Παρά την καρκινική της προέλευση, η σειρά διατηρεί πολλές από τις λειτουργίες των φυσιολογικών ηπατικών κυττάρων. Μορφολογικά, τα κύτταρα αυτής χαρακτηρίζονται ως οίωνοι-επιθηλιακά, σχηματίζοντας μονόστιβες

καλλιέργειες και εκκρίνοντας πρωτεΐνες πλάσματος (Donato et al., 2015). Το γεγονός ότι τα HepG2 προσομοιώνουν λειτουργικά τα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, τα καθιστά ιδανικά για *in vitro* αναλύσεις που στοχεύουν στην κατανόηση της βιοδιαθεσιμότητας και βιοδραστικότητας των ενώσεων (Emma et al., 2021).

3.5.2 Συνθήκες καλλιέργειας

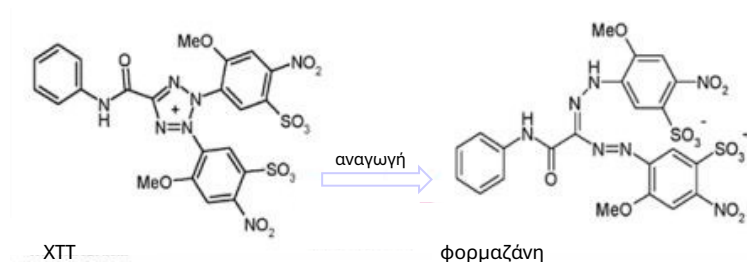
Τα κύτταρα της σειράς HepG2 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες T-25 και T-75 με επιφάνειες ανάπτυξης 25cm² και 75cm² αντίστοιχα. Το μέσο ανάπτυξης, ήταν το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και pH=7.2, ενισχυμένο με 10% v/v FBS (εμβρυικός βόειος ορός), 2mM L-γλουταμίνη και 1% v/v pen-strep (αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης 100 units/ml και στρεπτομυκίνης 100μg/ ml) και οι συνθήκες διατήρησης, οι 37°C σε κλίβανο με παροχή 5% CO₂. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιούνταν κάθε φορά που η φλάσκα είχε καλυφθεί στο ~80% (~κάθε 48h), με προσθήκη 0.25% τρυψίνης για 3' στους 37°C (πρωτεάση/ παγκρεατικό ένζυμο που υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς, συμβάλλοντας στην απομόνωση των κυττάρων που σε μονόστιβες καλλιέργειες συγκρατούνται τόσο μεταξύ τους όσο και με το υπόστρωμα), ακολουθούμενη από επαναπροσθήκη θρεπτικού (DMEM+FBS) για απενεργοποίηση του ενζύμου, που δυνητικά θα μπορούσε να οδηγήσει στο θάνατο τα κύτταρα .

Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματοειδούς ροής (laminar flow), επιπέδου βιοασφάλειας τύπου II, εξασφαλίζοντας ασηπτικές συνθήκες και αποτρέποντας την επιμόλυνση.

3.5.3 Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο ΧΤΤ

Προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση συγκεντρώσεων του δείγματος με κυτταροτοξική δράση, και να είναι εφικτή η εκτίμηση της επίδρασής τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας ΧΤΤ, μέσω του ΧΤΤ cell viability assay kit (Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)). Η μέθοδος ΧΤΤ, που χρησιμοποιείται για την ποσοτική εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μεταβολικής ενεργότητας του κυτταρικού πληθυσμού, δεν είναι παρά μια χρωματομετρική, μη ραδιενεργή δοκιμή, παρόμοια με τη δοκιμή ΜΤΤ,

αλλά πιο ευαίσθητη και φιλική προς το κύτταρο. Αναλυτικά, η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος ΧΤΤ, που είναι άχρωμο και αρνητικά φορτισμένο, σε φορμαζάνη, που είναι υδατοδιαλυτή και προσδίδει χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα. Η μετατροπή καταλύεται από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες ζωντανών κυττάρων, ενώ το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά, καθώς απορροφά στα 450nm. Μικρή απορρόφηση συνεπάγεται τη μικρή αναγωγική ικανότητα του ΧΤΤ, το μικρό αριθμό ζωντανών κυττάρων και άρα την κυτταροτοξική δράση της συγκεκριμένης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



Εικόνα 21: Μετατροπή τετραμμωνιακού άλατος σε φορμαζάνη

Πειραματική διαδικασία

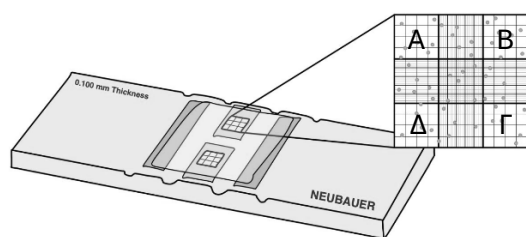
Την πρώτη μέρα, αφού τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό έπειτα από ενζυμική επεξεργασία (τρυψινοποίηση), μεταφέρθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση τους ανά ml. Έτσι έγινε υπολογισμός των ml που περιείχαν 10.000 κύτταρα και επίστρωση του αριθμού αυτού σε πηγαδάκια μικροπλάκας 96 θέσεων. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκε επιπλέον θρεπτικό μέσο DMEM (10% FBS), καταλαμβάνοντας έναν όγκο 100μl και σε τελική φάση έγινε επώαση σε κλίβανο για 24 ώρες.

Τη δεύτερη ημέρα έγινε προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος φυτικής προέλευσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, απουσία FBS. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Την τελευταία ημέρα προστέθηκαν 50μl αντιδραστήριου ΧΤΤ (αναλογία αντιδραστηρίων A-B, 49:1 αντίστοιχα). Μετά το πέρας επώασης 4 ωρών στους 37°C, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε 2 μήκη κύματος (450nm και 630nm) και ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών ELISA. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε χάρη στις μετρήσεις που λήφθηκαν στα 630nm ($A = A_{450nm} - A_{630nm}$), ενώ στη μέθοδο γενικά διαμορφώθηκαν τρεις συνθήκες (κύτταρα

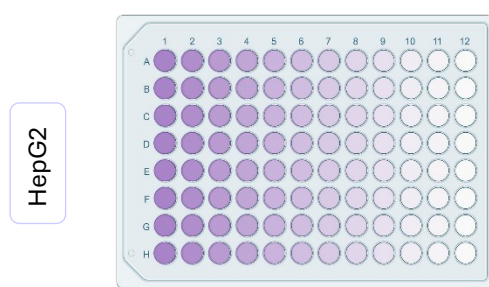
control, κύτταρα θετικού control+H₂O₂, κύτταρα+H₂O₂+δείγμα). Η προσθήκη H₂O₂ (250μM) έγινε προκειμένου να επαχθεί στα κύτταρα οξειδωτικό στρες που μειώνει την βιωσιμότητα τους, και να αξιολογηθεί το δείγμα ως προς την προστατευτική του δράση. Η εξέταση των διαφόρων συγκεντρώσεων του δείγματος έγινε με 3 ανεξάρτητα πειράματα, σε καθένα από τα οποία κάθε συγκέντρωση ελέγχθηκε συνολικά 3 φορές.

Πίνακας 3: Υπολογισμός απορροφήσεων θρεπτικού και δείγματος στα 450nm μέσω διαμόρφωσης των -Control και -Sample που δεν έχουν κύτταρα

+Control	κύτταρα+θρεπτικό	Απορρόφηση θρεπτικού
-Control	θρεπτικό	
+Sample	κύτταρα+θρεπτικό+δείγμα	Απορρόφηση δείγματος
-Sample	θρεπτικό+δείγμα	



Εικόνα 22: πλάκα Neubauer



Εικόνα 23: 96-well plate

Η % βιωσιμότητα των κυττάρων προέκυψε με τη χρήση του ακόλουθου τύπου:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = [(Abs_{\text{μάρτυρα}} - Abs_{\text{δείγματος}}) / Abs_{\text{μάρτυρα}}] \times 100\%$$

*Abs= οπτική απορρόφηση

Από τη μέθοδο επιλέχθηκαν τελικά 3 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις: 0.39, 0.78, 1.56 (mg/ml), παρουσία οξειδωτικού παράγοντα.

3.5.4 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ευαίσθητη και αυτοματοποιημένη τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα. Μέσω αυτής είναι εφικτή η ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών και κυτταρικών συστατικών ανά κύτταρο που βρίσκεται μέσα σε διάλυμα και κινείται

σε ρεύμα με σταθερή ταχύτητα. Η υδροδυναμική εστίαση εξασφαλίζει τη μεμονωμένη κίνηση των κυττάρων το ένα πίσω από το άλλο διαμέσου θαλάμου ροής έως ότου αυτά φτάσουν στην περιοχή ανίχνευσης, όπου απαντάται μια εστιαζόμενη πηγή φωτός. Η σκέδαση του φωτός και τα φθορίζοντα σήματα μετατρέπονται σε ψηφιακά δεδομένα και σε τελική φάση αναλύονται από υπολογιστικά συστήματα.

* Η παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση σε κυτταρόμετρο ροής προϋποθέτει εναιώρημα μονοκυττάρων και όχι συσσωματώματα.

Χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος στον κυτταρικό πληθυσμό

Μόλις οι φλάσκες κυττάρων καλύφθηκαν στο ~80% έγινε ανασύσταση και υπολογίσθηκε ο αριθμός κυττάρων για καλλιέργεια κατά τρόπο τέτοιο που υπήρχαν σε κάθε πηγαδάκι ενός 6-well plate (μικροπλάκα 6 θέσεων) 300.000 κύτταρα. Προστέθηκε DMEM (10% FBS) με $V_{\text{τελ}}=2\text{ml}/\text{πηγαδάκι}$ και ακολούθησε επώαση για 24h. Το αμέσως επόμενο 24ωρο απομακρύνθηκε το πλήρες θρεπτικό και τη θέση του κατέλαβαν 200μl δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις και 1800μl DMEM+αντιβιοτικό, απουσία όμως FBS, καθώς δεν απαιτούνταν περαιτέρω ενίσχυση των κυττάρων. Οι συνθήκες control συμπληρώθηκαν με 2ml θρεπτικό και πάλι απουσία FBS. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C.

*Πριν το πέρας των 24h για την επώαση με την εξεταζόμενη ουσία έγινε αφαίρεση θρεπτικού μέσου, πλύση με PBS και προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα 250μM H_2O_2 για 1h.

Συνολικά στρώθηκαν 3 6-well plate προκειμένου να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία και επαναληψιμότητα του πειράματος, με καθένα από αυτά να δίνει μετρήσεις τόσο για GSH όσο και για ROS.

Πίνακας 4: Συνθήκες σε 6-well plate

	Control-	Control+	S ₁	S ₂	S ₃
Κύτταρα	+	+	+	+	+
H ₂ O ₂		+	+	+	+
C _{δειγμ.} = 0.39 mg/ml			+		

C _{δειγμ.} = 0.78 mg/ml				+	
C _{δειγμ.} = 1.56 mg/ml					+

3.5.4.1 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων της GSH

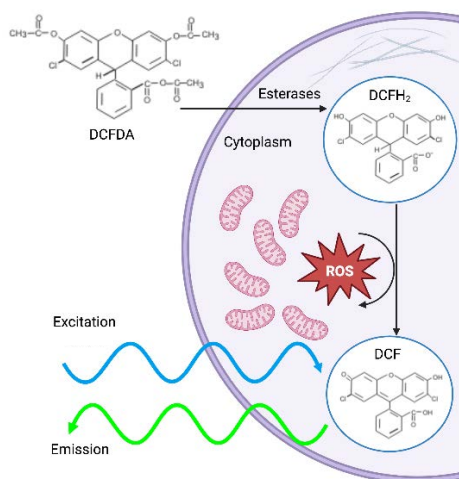
Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) προσδιορίστηκαν με τη χρήση της χρωστικής Thiol green (Abcam (Cambridge, UK)) (διέγερση 490nm, εκπομπή 520nm), που διεισδύει σε ζωντανά κύτταρα και αντιδρά με θειολικές ομάδες (-SH), σχηματίζοντας τελικά φθορίζοντα προϊόντα. Η ένταση του φθορισμού που ανιχνεύεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης GSH στο κύτταρο.

Πειραματική διαδικασία

Το κυτταρικό αιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε συνθήκες 1500rpm, 5min, 4°C, προκειμένου να απομακρυνθεί το ρυθμιστικό διάλυμα και το ίζημα υπέστη χρώση με 1ml Thiol green (Intracellular GSH assay kit, Abcam). Ακολούθως έγινε επώαση σε κλίβανο για μισή ώρα. Τα κύτταρα στο διάλυμα φυγοκεντρήθηκαν και πάλι σε όμοιες συνθήκες και την απομάκρυνση του υπερκειμένου ακολούθησε η επαναδιάλυση τους σε 400μl PBS. Τελικά το κυτταρικό αιώρημα κάθε συνθήκης μεταφέρθηκε σε σωληνάκια κυτταρόμετρου.

3.5.4.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων των ROS

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) στο εσωτερικό των κυττάρων εκτιμήθηκαν ποσοτικά χάρη στην ένωση 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Gibco (Thermo Fisher Scientific, UK)). Πρόκειται για μια ουσία που αποακετυλιώνεται αρχικά μέσω ενδογενών εστερασών και έπειτα οξειδώνεται από ROS σε DCF. Η διέγερση της DCF (490nm) οδηγεί τελικά σε εκπομπή σημάτων φθορισμού (520nm), με την ένταση να είναι ανάλογη των επιπέδων των ROS.



Εικόνα 24: Μηχανισμός δράσης DCF-DA
(Woodley S., 2025)

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων GSH, με τις μόνες διαφορές ότι στην προκειμένη έγινε προσθήκη ανά tube 1.5ml διαλύματος DCF-DA (10μM), και επώαση για 40 λεπτά σε κλίβανο, με ενδιάμεση ήπια ανάδευση ανά 10 λεπτά.

3.5.5 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω αντιδραστηρίου Bradford

Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε κυτταρικό εναιώρημα προσδιορίσθηκε ποσοτικά με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford, η οποία στηρίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε πρωτεΐνες. Αναλυτικά, η χρωστική αλληλεπιδρά κυρίως με βασικά και αρωματικά αμινοξέα που δομούν τις πρωτεΐνες του προς εξέταση δείγματος, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής από τα 465nm στα 595nm. Το προϊόν της αντίδρασης είναι ένωση χρώματος μπλε και η απορρόφηση αυτής είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Πειραματική διαδικασία

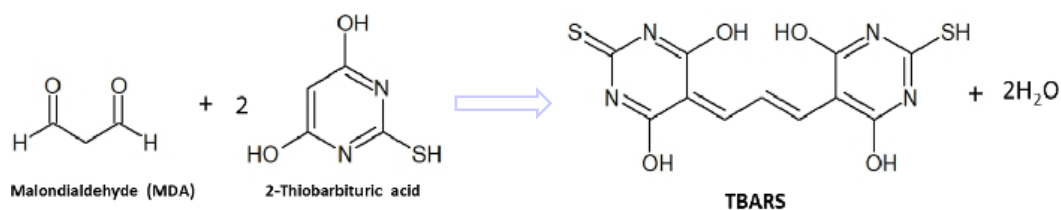
Σε πλαστικά σωληνάκια erppendorf 1.5ml προστέθηκαν 20μl δείγματος με 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση σε σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά και φωτομέτρηση στα 595nm. Οι μετρήσεις

πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0.03125mg/ml έως 2mg/ml, και από το διάγραμμα απορρόφησης συγκέντρωσης προέκυψε εξίσωση, η οποία χρησιμοποιήθηκε τελικά για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στο δείγμα κάθε συνθήκης.

* Η μέθοδος Bradford συνετέλεσε στην εύρεση της ποσότητας του κυτταρολύματος που περιείχε 80μg πρωτεΐνης.

3.5.6 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Η οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων προσδιορίσθηκε με το βιοδείκτη TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Σύμφωνα με τη μέθοδο, όταν τα λιπίδια του δείγματος οξειδώνονται, δημιουργούνται παραπροϊόντα που λόγω της ασταθής τους φύσης διασπώνται. Η μαλονδιαλδεϋδη, το κύριο προϊόν της διάσπασης, αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε αναλογία 1:2 και δίνει χρωμοφόρο σύμπλοκο που απορροφά στα 530nm, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την ποσοτικοποίηση του δευτερογενούς προϊόντος και την εκτίμηση του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 25: Σχηματισμός χρωμοφόρου

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικά σωληνάκια falcon 15ml προστέθηκαν 400- x μ l κυτταρικού αιωρήματος, όπου x = η ποσότητα του κυτταρολύματος που περιέχει 80μg πρωτεΐνης, και ο όγκος συμπληρώθηκε με PBS σε τελικό όγκο 400μl. Έπειτα προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200mM, pH=7.4) και 500μl τριχλωροξικού οξέος 35% και τα διαλύματα αναμείχθηκαν. Το βήμα διαδέχθηκαν επώαση σε RT για 10 λεπτά, προσθήκη 1ml διαλύματος θεικού νατρίου-θειοβαρβιτουρικού οξέος (2M-55mM), ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο (95 °C) για 45 λεπτά. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και

τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά, προκειμένου να ελαττωθεί η θερμοκρασία τους. Ακολούθως έγινε προσθήκη 1ml τριχλωροξικού οξέος 70%, ανάδευση, μεταφορά σε erpendorfs ($V_{\text{τελ}}=1\text{ml}$), φυγοκέντρηση (11200g, RT, 3min) και μέτρηση της απορρόφησης του υπερκειμένου στα 530nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου έγινε με τυφλό το οποίο περιείχε 400μl PBS και ίδιες ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων. Η μέθοδος επαναλήφθηκε για 4 ανεξάρτητα πειράματα, με το κάθε δείγμα να παρασκευάζεται εις διπλούν ανά επανάληψη πειράματος. Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = [(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0.156] * (3400 / X)$$

$\text{Abs}_{\text{δείγματος}}$ = η οπτική απορρόφηση του δείγματος

$\text{Abs}_{\text{τυφλού}}$ = η οπτική απορρόφηση του τυφλού

0.156= ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεΐδης ($\mu\text{mol/L}$)

3400= ο συνολικός όγκος της αντίδρασης (μl)

X= ο όγκος του κυτταρικού αιωρήματος (μl) ώστε στην αντίδραση να είναι διαθέσιμα 80μg πρωτεΐνης

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν τελικά ως nmol TBARS ανά mg πρωτεΐνης.

3.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad prism (version 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Αρχικά διενεργήθηκε έλεγχος της κατανομής των δειγμάτων (κανονικότητα) με το Shapiro-Wilk test, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα του ελέγχου έδειξαν ότι δεν υπήρχε κανονική κατανομή. Συνεπώς επιλέχθηκε εφαρμογή μη παραμετρικής στατιστικής ανάλυσης. Το Kruskal-Wallis test (One-way ANOVA non-parametric) πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της σημαντικότητας των μέσων τιμών μεταξύ περισσότερων από δύο ομάδων για τα cell-based αποτελέσματα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$ και τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ SEM (standard error of the means).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Cell-free assays

Ο Πίνακας 5 αποτυπώνει τα ποσοτικά αποτελέσματα των *in vitro* τεχνικών στις οποίες υπεβλήθη το παραπροϊόν. Σύμφωνα με αυτόν το δείγμα παρουσίασε αντιοξειδωτική και αναγωγική ισχύ συγκριτικά με τις ουσίες αναφοράς στις επιμέρους μεθόδους, με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στη μέθοδο Superoxide (IC₅₀: 0,01968 mg/ml) και υψηλότερη αναγωγική δράση στη μέθοδο Reducing Power (AU_{0.5}: 0,07056 mg/ml). Ακόμη επέδειξε αντιγενετοξική δράση έναντι γενετικών βλαβών επαγόμενων από ρίζες AAPH μέσω της δοκιμής Plasmid DNA relaxation assay, όπου παρατηρήθηκε χαμηλή τιμή IC₅₀, ίση με 0,18664 mg/ml. Στη μέθοδο ORAC που αξιοποιήθηκε ο λόγος των κλίσεων της εξίσωσης δείγματος και Trolox (Παράρτημα, σχήμα 2 & 3), το δείγμα σημείωσε αντιοξειδωτικό δυναμικό TE: 625,343 μmol TE/g, τιμή αντιπροσωπευτική της ικανότητας για αναστολή της οξείδωσης. Ενώ τέλος, στη μέθοδο Folin-Ciocalteu που προσδιόρισε το συνολικό πολυφαινολικό φορτίο με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού (Παράρτημα, σχήμα 1), το δείγμα κατέγραψε TPC: 16,9755 mg GA/g, υψηλό και χαρακτηριστικό για όλα τα παραπάνω.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής-αναγωγικής ικανότητας του εξεταζόμενου δείγματος, και συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου

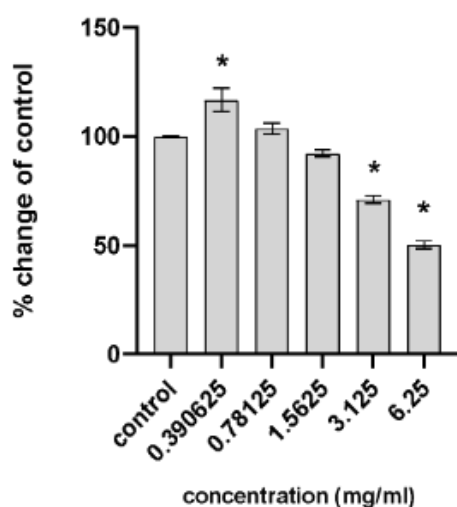
DPPH·	ABTS· ⁺	O ₂ · ⁻	Plasmid (AAPH)	RP	CUPRAC	ORAC	Folin- Ciocalteu
IC ₅₀ (mg/ml)				AU _{0.5} (mg/ml)		TE (μmol TE/g)	TPC (mg GAE/g)
0,09774	0,09463	0,01968	0,18664	0,07056	0,18043	625,343	16,9755

4.2 Cell-based assays

4.2.1 Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο XTT

Από τη μέθοδο XTT προέκυψε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία εμφανίστηκε κυτταροτοξικότητα η συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος ίση με 3,125 mg/ml. Συνεπώς, για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας και τη μέτρηση των επιπέδων ελεύθερων ριζών και γλουταθειόνης, καθώς και των επιπέδων

λιπιδικής υπεροξειδωσης επιλέχθηκαν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις 1,56, 0,78 και 0,39 mg/ ml (Γράφημα 1).



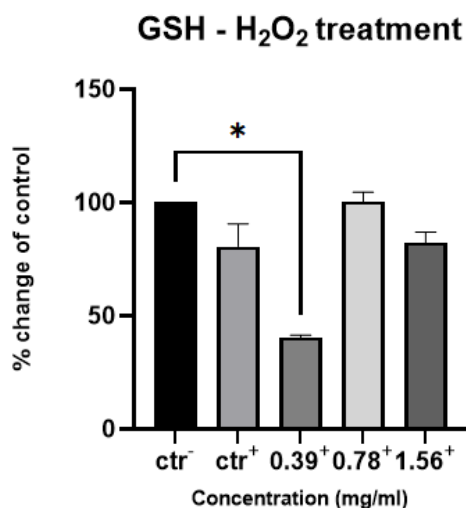
Γράφημα 1: Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας του παραπροϊόντος στην κυτταρική σειρά HepG2 με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και αποτυπώνονται ως mean±SEM, (n=3). * Στατιστική σημαντικότητα p<0.05.

4.2.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων της GSH

Η προσθήκη στην κυτταρική σειρά HepG2 μόνο εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης των κυττάρων. Σύμφωνα με το Γράφημα 2, η συγκέντρωση 0,39 mg/ ml δείγματος οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα GSH σε σχέση με το control- (p=0.023) αλλά και με το control+, ενώ οι συγκεντρώσεις 0,78 και 1,56 mg/ ml δείγματος δεν οδήγησαν σε στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 6: Μέσος όρος της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων GSH σε σύγκριση με το θετικό control (συνθήκη επαγωγής στρες) και τυπικό σφάλμα μέσου όρου ανά συνθήκη (GSH)

GSH (% of control)	mean	SEM
Control-	100	0
Control+	80,53	8,145
0,39+	40,41	0,723
0,78+	100,31	3,454
1,56+	82,31	3,778



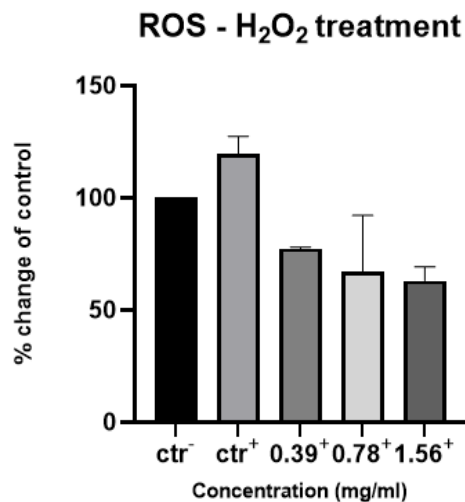
Γράφημα 2: Έλεγχος επίδρασης του παραπροϊόντος στα ενδογενή επίπεδα GSH της κυτταρικής σειράς HepG2, παρουσία του εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂ με κυτταρομετρία ροής και 24ωρη χορήγηση του δείγματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το αρνητικό control και αποτυπώνονται ως *mean*±*SEM*, (*n*=3). * Στατιστική σημαντικότητα *p*<0.05.

4.2.3 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων των ROS

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS μεταξύ των συνθηκών θετικού control (ctr⁺)/0,39+/0,78+/1,56+ mg/ml και αρνητικού control (ctr⁻). Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ένδειξη αύξησης των ROS έπειτα από επεξεργασία των κυττάρων μόνο με H₂O₂ και ένδειξη σταδιακής μείωσης των ROS έπειτα από επεξεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δείγματος σε σχέση με τη συνθήκη control.

Πίνακας 7: Μέσος όρος της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων ROS σε σύγκριση με το θετικό control (συνθήκη επαγωγής στρες) και τυπικό σφάλμα μέσου όρου ανά συνθήκη (ROS)

ROS (%of control)	mean	SEM
Control- H ₂ O ₂	100	0
Control+ H ₂ O ₂	119,56	6,452
0,39+	77,22	0,579
0,78+	67,10	20,52
1,56+	63,04	4,978



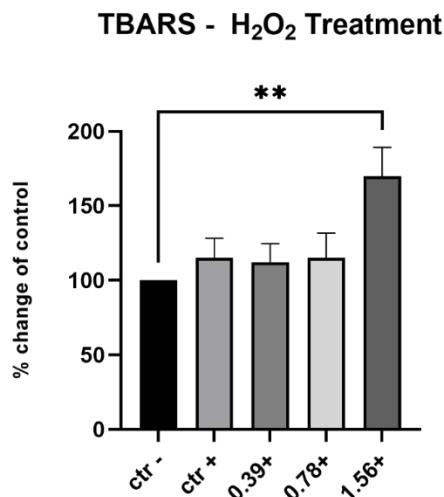
Γράφημα 3: Έλεγχος επίδρασης του παραπροϊόντος στα επίπεδα ROS της κυτταρικής σειράς HepG2, παρουσία του εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂ με κυτταρομετρία ροής και 24ωρη χορήγηση του δείγματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το αρνητικό control και αποτυπώνονται ως mean±SEM, (n=3). * Στατιστική σημαντικότητα p<0.05.

4.2.4 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Η χορήγηση εξωγενώς οξειδωτικού παράγοντα και δείγματος ανά αυξανόμενη συγκέντρωση είχε την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης, με τη συγκέντρωση 1,56 mg/ ml δείγματος να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (p=0.0082).

Πίνακας 8: Μέσος όρος της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων TBARS σε σύγκριση με το θετικό control (συνθήκη επαγωγής στρες) και τυπικό σφάλμα μέσου όρου ανά συνθήκη (TBARS)

TBARS (% of control)	mean	SEM
Control- H ₂ O ₂	100	0
Control+ H ₂ O ₂	111	10,9
0,39+	112	12,1
0,78+	115	16,8
1,56+	170	19,4



Γράφημα 4: Επίδραση του παραπροϊόντος στα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης της κυτταρικής σειράς HepG2, παρουσία του εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το αρνητικό control και αποτυπώνονται ως *mean*±*SEM*, (*n*=4). * Στατιστική σημαντικότητα *p*<0.05.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία προτείνει μια ολιστική *in vitro* προσέγγιση για την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής, αντιγеноτοξικής και προστατευτικής δράσης παραπροϊόντος ελαιουργίας στερεής φάσης, που στηρίζεται σε 2 συστήματα παρουσία και απουσία κυττάρων.

5.1 Cell-free assays

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του δείγματος καθώς και οι διάφορες *in vitro* δοκιμές έδειξαν πως το δείγμα είχε υψηλό πολυφαινολικό φορτίο με έντονη αντιοξειδωτική, αναγωγική και αντιγеноτοξική ισχύ. Η πολυφαινολική σύσταση που προσδιορίστηκε συγκριτικά με άλλες μελέτες για φύλλα ελιάς και ελαιοπυρήνα παρουσίασε σχετική ομοιότητα με φύλλα ελαιόκαρπου σε τελικό στάδιο ωρίμανσης (Οκτώβριος) (Kishikawa et al., 2015). Είναι ευρέως διαδεδομένο πως περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες καθορίζουν την ποσότητα, τη σύνθεση και τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών, επάγοντας ετερογένεια μεταξύ των τμημάτων του φυτού (Abaza et al., 2017). Έτσι, μεταβλητές όπως η δραστηριότητα ενδογενών ενζύμων, ο τύπος καλλιέργειας, η γεωγραφική περιοχή, η ποικιλία της ελιάς, η περίοδος συγκομιδής, οι αγρονομικές πρακτικές, οι συνθήκες επεξεργασίας και

αποθήκευσης του καρπού επιδρούν στα επίπεδα φαινολών που δομούν στερεά παραπροϊόντα (Kouka, Tsakiri, et al., 2019). Αυτά σε συνδυασμό με την αντιοξειδωτική δράση της ελαιοευρωπαϊκής και υδροξυτυροσόλης μπορούν να ευθύνονται για τις χαμηλές τιμές IC₅₀/ AU_{0.5} και των υπόλοιπων δοκιμών του εξεταζόμενου δείγματος. Μάλιστα η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης, που προκύπτει από την υδρόλυση της πιο άφθονης πολυφαινόλης στα φύλλα ελιάς, να δεσμεύει ROS και RNS έχει μελετηθεί καλά και βρίσκεται στο επίκεντρο για την παρασκευή εκχυλισμάτων πλούσιων σε HT που επιδιώκουν να παρέχουν τις μέγιστες ευεργετικές επιδράσεις (Kourti et al., 2024).

Βάσει αποτελεσμάτων η εξουδετέρωση τεχνητών ριζών (ABTS⁺, DPPH[•]) παρουσίασε ομοιότητα, υποδηλώνοντας την ικανότητα του δείγματος να εξουδετερώνει και τους 2 τύπους, με ελάχιστα μεγαλύτερη ευκολία ως προς τη ρίζα ABTS⁺ (χαμηλότερο IC₅₀). Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στους διαφορετικούς διαλύτες (νερό και μεθανόλη, αντίστοιχα) που χρησιμοποιούνται, καθώς και στο πλεονέκτημα της μεθόδου ABTS να ανιχνεύει τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια. Επιπλέον σύμφωνα με τους Re et al., 1999, η χαμηλή τιμή IC₅₀ στην μέθοδο ABTS πιθανότατα αντανακλά την υψηλή περιεκτικότητα του δείγματος σε υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά όπως η υδροξυτυροσόλη και η ελαιοευρωπαϊκή.

Όμοια, η ικανότητα αναστολής της ρίζας O₂^{•-}, που απαντάται και φυσιολογικά στον οργανισμό φάνηκε να είναι ιδιαίτερη έντονη, με την τιμή IC₅₀ να είναι ακόμα πιο χαμηλή από αυτές των μεθόδων DPPH, ABTS. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αρκετά σημαντικό, διότι υποδηλώνει πως το δείγμα μπορεί να αποτρέψει πιθανώς βλάβη σε βιολογικά συστήματα, επαγόμενη από ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου, που είναι πρόδρομος άλλων ROS (Winterbourn, 2008). Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι σύγκριση με μελέτες σε φύλλα ελιάς που ακολούθησαν διαφορετική τεχνική εκχύλισης των ενώσεων (Lins et al., 2018) έδειξε υπερέχουσα αντιοξειδωτική ισχύ για το προς ανάλυση δείγμα παραπροϊόντος ελαιουργίας, γεγονός που επισημαίνει την επίδραση των τεχνικών στην βιοδραστικότητα του δείγματος, και υπογραμμίζει τη δυναμική της αυτούσιας αξιοποίησής του.

Αναφορικά με την αναγωγική ισχύ, οι δοκιμές Reducing Power και CUPRAC επιβεβαίωσαν την ικανότητα του δείγματος να δρα και ως δότης ηλεκτρονίων.

Μάλιστα η μικρότερη τιμή AU0.5 στην πρώτη δοκιμή υπέδειξε ισχυρότερη προτίμηση και ικανότητα προς αναγωγή του Fe. Αξίζει βέβαια να αναφερθεί ότι υπάρχουν δημοσιεύσεις που καθιστούν τη δεύτερη δοκιμή πιο αντιπροσωπευτική της βιολογικής αντιοξειδωτικής δράσης καθώς αυτή είναι ικανή να ανιχνεύει εύρος ενώσεων (υψηλή ευαισθησία) και να λειτουργεί σε ουδέτερο pH (Apak et al., 2004).

Εν συνεχεία, το παραπροϊόν αξιολογήθηκε ως προς την προστατευτική δράση του έναντι της πρόκλησης πλασμιδιακής θραύσης από ROO[•]. Οι μετρήσεις αποκάλυψαν βιομοριακή προστασία, αποτροπή δηλαδή φαινομένων ρήξης της δίκλωνης έλικας, που δεν περιοριζόταν σε χημική εξουδετέρωση φυσικών και τεχνητών ριζών. Αυτό είναι σημαντικό διότι η οξειδωτική βλάβη σε μακρομόρια όπως το DNA έχει συσχετιστεί με καρκίνο, γήρανση και διάφορες άλλες παθήσεις (Poetsch, 2020).

Τελικώς, διενεργήθηκε η τεχνική ORAC για τη δυναμική καταγραφή αναστολής της οξειδωσης, παρέχοντας έτσι μια σφαιρική εικόνα δράσης του δείγματος ως αντιοξειδωτικό. Η ανάλυση αποκάλυψε υψηλή τιμή ORAC και δυνατότητα εξουδετέρωσης περοξυλικών ριζών, ενώ σύγκριση με τη βιβλιογραφία Moudache et al., 2016, επαλήθευσε την αξία του δείγματος ως πηγή αντιοξειδωτικών με χρήση σε φαρμακοδιατροφικούς κλάδους.

5.2 Cell-based assays

Η παρούσα μελέτη κατέδειξε ακόμα τη βιολογική επίδραση του δείγματος σε κυτταρικό επίπεδο, μέσω δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 ως ανάλογη του ήπατος που συνιστά το κύριο όργανο μεταβολισμού και αποτοξίνωσης, με άμεση και συχνή έκθεση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αρχικά διερευνήθηκε το όριο συγκέντρωσης πάνω από το οποίο το δείγμα εμφάνισε κυτταροτοξικές επιδράσεις. Η δοκιμή XTT, τα αποτελέσματα της οποίας σύμφωνα με άλλες μελέτες είναι ιστοειδικά (Kouka, et al., 2019), έδειξε κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις άνω των 3,125 mg/ ml. Έπειτα κυτταρομετρία ροής αποτύπωσε τα επίπεδα GSH και ROS μετά από επεξεργασία των HepG2 με οξειδωτικό παράγοντα και δείγμα. Τα αποτελέσματα αυτής αποκάλυψαν σημαντική μείωση στα επίπεδα GSH στη μικρότερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση σε σχέση με τις συνθήκες control και αύξηση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η ανηγμένη

γλουταθειόνη είναι ένα από τα βασικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια με ρόλους σε κυτταρική σηματοδότηση, αποτοξίνωση και μεταβολικές οδούς. Μπορεί να αντιδρά άμεσα με H_2O_2 και η εξάντληση της αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες, ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν αυξημένη μεταβολική ενεργότητα. Ωστόσο η δράση της επεκτείνεται και σε παραγωγή ROS. Το αποτέλεσμα της μείωσης έτσι θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια πιθανή προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών έπειτα από την υπέρβαση ενός κρίσιμου σημείου συγκέντρωσης όπως άλλωστε έχει αποδοθεί και σε βιβλιογραφία που τονίζει επιπροσθέτως ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι περισσότερο ευάλωτα σε βλάβη προερχόμενη από προοξειδωτικές πολυφαινόλες (Babich et al., 2011). Ενώ το αποτέλεσμα της αύξησης/επαναφοράς των επιπέδων GSH στις υψηλότερες συγκεντρώσεις θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή ενεργοποίηση αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Όσον αφορά τα επίπεδα ROS, σε αντίθεση με αυτά της GSH, δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, παρουσίασαν ωστόσο μια ένδειξη μείωσης. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες ή σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς δεν συνοδεύονται πάντα από στατιστικώς σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου (Kouka et al., 2019). Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος διερευνήθηκε περαιτέρω, μέσω εκτίμησης των επιπέδων λιπιδικής υπεροξείδωσης (TBARS). Τα αποτελέσματα της δοκιμής επέδειξαν αύξηση της λιπιδικής βλάβης στην υψηλότερη συγκέντρωση δείγματος (1,56 mg/ml) συγκριτικά με τις συνθήκες control. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί και πάλι από την προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών της ελιάς που έχει βρεθεί πως είναι δοσοεξαρτώμενη και συνδεδεμένη με τη δομή τους, τροποποιώντας έτσι ανά περίπτωση τον τύπο της κυτταρικής απόκρισης. Συμπερασματικά λοιπόν, το εξεταζόμενο παραπροϊόν ελαιουργίας φάνηκε να έχει ικανότητα επαγωγής οξειδωτικών μεταβολών σε ηπατοκύτταρα, έπειτα από χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα, μεταβάλλοντας τα ενδογενή επίπεδα GSH, ROS, και TBARS, και επιδρώντας πιθανώς στο αντιοξειδωτικό τους δυναμικό. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω αποδίδουν μεταβλητότητα στην αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του δείγματος μεταξύ in vitro και in vivo-like δοκιμών.

5.3 Γενικά συμπεράσματα, μελλοντικά βήματα και προοπτικές

Σήμερα ο υγιεινός τρόπος ζωής και το μεσογειακό διατροφικό πρότυπο - ευ ζην - που επιτάσσει η κοινωνία, προωθούν ακόμη περισσότερο την καλλιέργεια και παραγωγή ελιάς και ελαιόλαδου, οξύνοντας το περιβαλλοντικό αντίκτυπο από τα παραπροϊόντα ελαιουργίας που παράγονται. Για την αποφυγή της απόρριψης και την προαγωγή της μετάβασης από ένα γραμμικό σε ένα κυκλικό μοντέλο οικονομίας αναπτύσσονται διαρκώς στρατηγικές διαχείρισης των παραπροϊόντων που παράγονται από τα ελαιοτριβεία (Otero et al., 2021).

Παρόλο που η ποιοτική και ποσοτική σύσταση των αποβλήτων αυτών είναι πλέον γνωστή μέσω τεχνικών HPLC-MS/ HPLC-UV και οι τεχνολογίες ανάκτησης των ενώσεων τους συνιστούν πεδίο που μέχρι πρότινος έχει διερευνηθεί επαρκώς για το πράσινο αποτύπωμα και την αποφυγή της αλλοίωσης τους, οι γνώσεις γύρω από τις βιολογικές ιδιότητες και το μηχανισμό δράσης τους εκλείπουν (Soares et al., 2024), (Mir-Cerdà et al., 2025). Πολυάριθμες μελέτες κάνουν λόγο για το αντιοξειδωτικό δυναμικό στερεών παραπροϊόντων μέσω *in vitro* δοκιμών που προαναφέρθηκαν και μη (Otero et al., 2021). Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν απλώς ενδείξεις καθώς σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρούνται τροποποιήσεις που μπορεί να διαφέρουν ακόμα περισσότερο σε *in vivo* συστήματα που περικλείουν ζωικά μοντέλα και ανθρώπινους οργανισμούς (Kouka, Tekos, et al., 2019).

Η βιοπροσβασιμότητα και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινόλων επηρεάζουν γενικώς τη βιοδραστικότητα τους. Παράγοντες όπως η φυτική προέλευση και φυσική δομή, η χημική σύνθεση και αντίδραση με άλλα δραστικά συστατικά, οι συνθήκες επεξεργασίας και το περιβάλλον του ξενιστή καθορίζουν την πορεία προς τη συστημική κυκλοφορία και την έκταση της δράσης στις θέσεις-στόχους (Markhalí et al., 2020). Ιδιαίτερα οι εντερικοί και συστημικοί παράγοντες του ξενιστή επιδρούν καταλυτικά. Οι πολυφαινόλες ως μόρια μεγάλου μοριακού μεγέθους απορροφώνται δύσκολα και χρήζουν καταβολισμού. Αν και η υδρόλυση τους λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο, η κύρια βιομετατροπή τους πριν την άφιξη σε κύτταρα και ιστούς πραγματοποιείται στο ήπαρ, μέσω ενζύμων. Οι τροποποιήσεις αυτές έτσι μεταβάλλουν τη λειτουργικότητα και τη δομή τους που μπορεί να διαφέρει τελικά πολύ από την αρχική διαιτητική τους μορφή (D'Archivio et al., 2010). Συμπερασματικά,

από τα παραπάνω καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για ανάπτυξη στρατηγικών που βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα και αυξάνουν τη βιολογική δραστικότητα των πολυφαινολών.

Αν και η διεξαγωγή *in vivo* πειραμάτων για τη μελέτη της κλινικής σημασίας του δείγματος είναι τεχνικά δυνατή, οι απαιτήσεις για πόρους, υποδομές και άδειες δεοντολογίας θα υπερέβαιναν τα όρια της παρούσας πτυχιακής. Ως εκ τούτου μια ρεαλιστική συνέχεια της έρευνας θα μπορούσε να περιέχει *in vitro* δοκιμές όπως οι Ames (αντιμεταλλαξιγόνος δράση), Comet (γονιδιοπροστατευτική δράση) (Kouka, Tekos, et al., 2019) και Real Time PCR για στόχους του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικής άμυνας καθώς οι πολυφαινόλες επάγουν την αποκόλληση του Nrf2 από Keap1, τη μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και την επακόλουθη έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων) (Nwachukwu et al., 2021) και προεκτάσεις σε άλλες κυτταρικές σειρές όπως HeLa (καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας-αντικαρκινική δράση), RBL-2H3 (βασεόφιλα-αντιαλλεργιογόνος δράση), RAW267.4 (μακροφάγα-αντιφλεγμονώδης δράση) και SH-SY5Y (νευροβλαστικά κύτταρα-νευροπροστασία) (Granato, 2023).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εισαγωγή

Aksehirli-Pakyurek, M., Koubouris, G. C., Petrakis, P. V., Hepaksoy, S., Metzidakis, I. T., Yalcinkaya, E., & Doulis, A. G. (2017). Cultivated and wild olives in Crete, Greece—genetic diversity and relationships with major Turkish cultivars revealed by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 35(6), 575–585. <https://doi.org/10.1007/s11105-017-1046-y>

Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones*, 121, 109–141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

Azat Aziz, M., Shehab Diab, A., & Abdulrazak Mohammed, A. (2019). Antioxidant categories and mode of action. In *Antioxidants*. IntechOpen. DOI:10.5772/intechopen.83544

Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., & Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings. Biological Sciences*, 280(1756), 20122833. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2833>

Bisht, S., & Dada, R. (2017). Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 9(3), 420–447. <https://doi.org/10.2741/s495>

Bombarely, A., Doulis, A. G., Lambrou, K. K., Zioutis, C., Margaritis, E., & Koubouris, G. (2021). Elucidation of the origin of the monumental Olive tree of Vouves in Crete, Greece. *Plants*, 10(11), 2374. <https://doi.org/10.3390/plants10112374>

Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30(4), 449–462.

<https://doi.org/10.1007/s00299-010-0991-9>

Chiofalo, B., Di Rosa, A. R., Lo Presti, V., Chiofalo, V., & Liotta, L. (2020). Effect of supplementation of herd diet with Olive cake on the composition profile of milk and on the composition, quality and sensory profile of cheeses made therefrom. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(6), 977. <https://doi.org/10.3390/ani10060977>

Duda-Chodak, A., & Tarko, T. (2023). Possible side effects of polyphenols and their interactions with medicines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6).

<https://doi.org/10.3390/molecules28062536>

Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>

Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>

Grant, M. M., & Chapple, I. L. C. (2009). Antioxidants and periodontal disease. In *Food Constituents and Oral Health* (pp. 225–239). Elsevier.

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. *Cells (Basel, Switzerland)*, 11(3), 552.

<https://doi.org/10.3390/cells11030552>

Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. A. (2021). Olive (*Olea europaea* L.)—morphology, taxonomy, composition and health benefits. In *Fruits*

Grown in Highland Regions of the Himalayas (pp. 117–129). Springer International Publishing.

Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F. I., Aragonès, G., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2019). A comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. *Food Chemistry*, 299(125092), 125092. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125092>

Ji, L. L., & Yeo, D. (2021). Oxidative stress: an evolving definition. *Faculty Reviews*, 10, 13. <https://doi.org/10.12703/r/10-13>

Khammash, D., Rajagopal, S. K., & Polk, T. A. (2023). The neurobiology of aging. In *Neurobiology of Brain Disorders* (pp. 977–993). Elsevier.

Khwaldia, K., Attour, N., Matthes, J., Beck, L., & Schmid, M. (2022). Olive byproducts and their bioactive compounds as a valuable source for food packaging applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1218–1253. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12882>

Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., Dimopoulou, S., Sarikaki, G., Stathopoulos, P., Veskoukis, A. S., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin Olive oils is correlated with their antioxidant potency. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1870965. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>

Lapenna, D. (2023). Glutathione and glutathione-dependent enzymes: From biochemistry to gerontology and successful aging. *Ageing Research Reviews*, 92(102066), 102066. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102066>

Li, B., Ming, H., Qin, S., Nice, E. C., Dong, J., Du, Z., & Huang, C. (2025). Redox regulation: mechanisms, biology and therapeutic targets in diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 72. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02095-6>

Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and*

Molecular Medicine, 14(4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>

Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>

Lu, W., Shi, Y., Wang, R., Su, D., Tang, M., Liu, Y., & Li, Z. (2021). Antioxidant activity and healthy benefits of natural pigments in fruits: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4945. <https://doi.org/10.3390/ijms22094945>

Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, 736837. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>

Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>

Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 20, 956–967. <https://doi.org/10.17179/excli2021-3596>

Maleki Dana, P., Sadoughi, F., Mansournia, M. A., Mirzaei, H., Asemi, Z., & Yousefi, B. (2021). Targeting Wnt signaling pathway by polyphenols: implication for aging and age-related diseases. *Biogerontology*, 22(5), 479–494. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09934-x>

Markakis, E. A., Roditakis, E. N., Kalantzakis, G. S., Chatzaki, A., Soultatos, S. K., Stavrakaki, M., Tavlaki, G. I., Koubouris, G. C., Bagkis, N., & Goumas, D. E. (2021). Characterization of fungi associated with Olive fruit rot and Olive oil degradation in Crete, southern Greece. *Plant Disease*, 105(11), 3623–3635. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2227-RE>

Matés, J. M., Campos-Sandoval, J. A., de Los Santos-Jiménez, J., & Márquez, J. (2020). Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Archives of Toxicology*, 94(8), 2603–2623. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02838-8>

- Medina, J., & Gupta, V. (2025). Vitamin E. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Nie, S., Cui, S. W., & Xie, M. (2018). Introduction. In *Bioactive Polysaccharides* (pp. 1–50). Elsevier.
- Otero, P., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Barral-Martinez, M., Chamorro, F., Echave, J., Garcia-Perez, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Applications of by-products from the olive oil processing: Revalorization strategies based on target molecules and green extraction technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 1084–1104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.007>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 34(6), 1093–1097. <https://doi.org/10.1139/H09-115>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Powers, S. K., Nelson, W. B., & Hudson, M. B. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(5), 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009>
- Rachwał, K., & Gustaw, K. (2025). Plant-derived phytobiotics as emerging alternatives to antibiotics against foodborne pathogens. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, 15(12), 6774. <https://doi.org/10.3390/app15126774>

Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., & Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14264. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>

Sales, H., Šatović, Z., Alves, M. L., Fevereiro, P., Nunes, J., & Vaz Patto, M. C. (2021). Accessing ancestral origin and diversity evolution by net divergence of an ongoing domestication Mediterranean Olive tree variety. *Frontiers in Plant Science*, 12, 688214. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.688214>

Sciubba, F., Chronopoulou, L., Pizzichini, D., Lionetti, V., Fontana, C., Aromolo, R., Socciaelli, S., Gambelli, L., Bartolacci, B., Finotti, E., Benedetti, A., Miccheli, A., Neri, U., Palocci, C., & Bellincampi, D. (2020). Olive mill wastes: A source of bioactive molecules for plant growth and protection against pathogens. *Biology*, 9(12), 450. <https://doi.org/10.3390/biology9120450>

Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23(7), 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Singh, M. P., & Kumar, A. (Eds.). (2017). *Incredible world of biotechnology*. Nova Science.

Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397–1400. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397>

Taiz, L., Zeiger, E., Moeller, I. M., & Murphy, A. (Eds.). (2017). *Plant Physiology And Development* (6th ed.). Sinauer Associates.

Tumilaar, S. G., Hardianto, A., Dohi, H., & Kurnia, D. (2024). A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Overview, clinical applications,

global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry*, 2024, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2024/5594386>

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>

Wan, Y., Liu, J., Mai, Y., Hong, Y., Jia, Z., Tian, G., Liu, Y., Liang, H., & Liu, J. (2024). Current advances and future trends of hormesis in disease. *Npj Aging*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00155-3>

Zhang, H., Wang, M., & Xiao, J. (2022). Stability of polyphenols in food processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 102, 1–45. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.006>

Αλεξάκης Σ. Αλέξανδρος. (1998). *‘Το ελαιόλαδο και η παραγωγή του’*. Εκδόσεις Μιχάλη Σιδέρη.

Βασιλακάκης, Μ., (2016). *Γενική και Ειδική Δενδροκομία*. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη, Ελλάς. Ε.Ε.

Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, Α. (2003). *Βιοχημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.

Βλαχάκης, Γ. (2005). *Η ελιά και το λάδι: Μύθος και ιστορία*. Ελληνικά Γράμματα.

Δ. Παπαγιαννόπουλος στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη, Αθήνα

Ζαρμπούτης, Γ. Β., & Γκακνή, Α. Ι. (2009). *Γεωργικές Καλλιέργειες*. Εκδόσεις ΙΩΝ.

Θεριός, Ι. (2005). *Ελαιοκομία*. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη, Ελλάς, Ε.Ε.

Υλικά και μέθοδοι

Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1250, 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5

Emma, M. R., Augello, G., Di Stefano, V., Azzolina, A., Giannitrapani, L., Montalto, G., Cervello, M., & Cusimano, A. (2021). Potential uses of Olive oil secoiridoids for the prevention and treatment of cancer: A narrative review of preclinical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1234. <https://doi.org/10.3390/ijms22031234>

Hep G2 [HEPG2]. (n.d.). Atcc.org. Retrieved June 17, 2025, from <https://www.atcc.org/products/hb-8065>

Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 30(4), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>

Sridevi Pingali, Srujana Budde, Neeraja T, Bhagavan Raju M and Dattatreya Adapa. (2018). Anti-Oxidants and their Role in Disease Managment. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 7(3), 175–190.

Woodley, S. (2025). DCFDA Mechanism of Action. <https://app.biorender.com/biorendertemplates/details/t65117fb8ef6a1f639115f8c5-dcfda-mechanism-of-action>

Συζήτηση

Abaza, L., Taamalli, A., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., & Youssef, N. B. (2017). Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 100(Pt 3), 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.002>

Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>

- Babich, H., Schuck, A. G., Weisburg, J. H., & Zuckerbraun, H. L. (2011). Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology*, 2011, 467305. <https://doi.org/10.1155/2011/467305>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Granato, D. (2023). Cellular antioxidant activity measurement: An alternative to chemical antioxidant methods? *Food Safety and Health*, 1(1), 9–12. <https://doi.org/10.1002/fsh3.12012>
- Kishikawa, A., Ashour, A., Zhu, Q., Yasuda, M., Ishikawa, H., & Shimizu, K. (2015). Multiple biological effects of Olive oil by-products such as leaves, stems, flowers, Olive milled waste, fruit pulp, and seeds of the Olive plant on skin: Biological activities of Olive oil by-products on skin. *Phytotherapy Research: PTR*, 29(6), 877–886. <https://doi.org/10.1002/ptr.5326>
- Kouka, P., Tekos, F., Valtas, K., Mavros, P., Veskoukis, A. S., Angelis, A., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncology Reports*, 42(6), 2814–2825. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7386>
- Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., Dimopoulou, S., Sarikaki, G., Stathopoulos, P., Veskoukis, A. S., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin Olive oils is correlated with their antioxidant potency. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1870965. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>
- Kourti, M., Skaperda, Z., Tekos, F., Stathopoulos, P., Koutra, C., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2024). The bioactivity of a hydroxytyrosol-enriched extract originated after direct hydrolysis of Olive leaves from Greek cultivars. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(2). <https://doi.org/10.3390/molecules29020299>
- Lins, P. G., Marina Piccoli Pugine, S., Scatolini, A. M., & de Melo, M. P. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on

oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon*, 4(9), e00805.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805>

Markhali, F. S., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Olive tree leaves—A source of valuable active compounds. *Processes (Basel, Switzerland)*, 8(9), 1177.
<https://doi.org/10.3390/pr8091177>

Mir-Cerdà, A., García-García, R., Granados, M., Sentellas, S., & Saurina, J. (2025). Exploring polyphenol content in olive leaf waste: effects of geographical, seasonal and varietal differences. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 215(114347), 114347.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.114347>

Moudache, M., Colon, M., Nerín, C., & Zaidi, F. (2016). Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry*, 212, 521–527.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.001>

Nwachukwu, I. D., Sarteshnizi, R. A., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2021). A concise review of current in vitro chemical and cell-based antioxidant assay methods. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4865.
<https://doi.org/10.3390/molecules26164865>

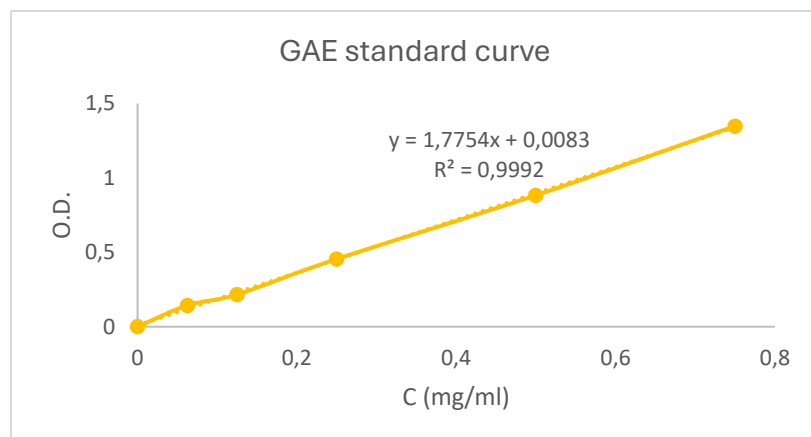
Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 207–219.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

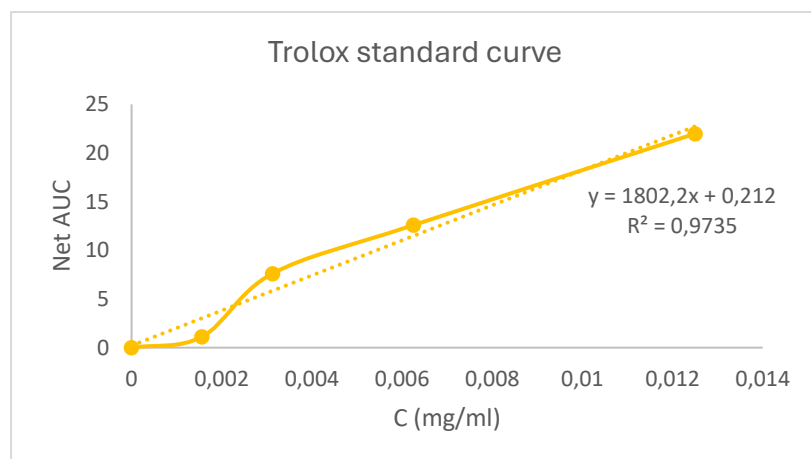
Soares, T. F., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2024). From Olive oil production to by-products: Emergent technologies to extract bioactive compounds. *Food Reviews International*, 1–28. <https://doi.org/10.1080/87559129.2024.2354331>

Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278–286.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.85>

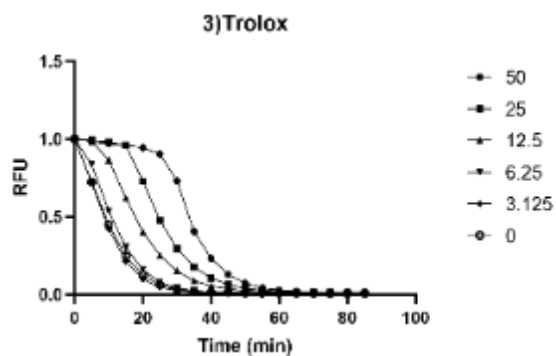
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού Οξέος



Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη Trolox



Σχήμα 3: Καμπύλη ORAC για το Trolox [σχηματική αναπαράσταση του σχετικού φθορισμού (RFU= relative fluorescence units) προς το χρόνο (time) στη δοκιμασία ORAC για τις διάφορες συγκεντρώσεις Trolox (όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση τόσο μεγαλύτερη η αναστολή της μείωσης φθορισμού της φλουοροσκεΐνης)]