

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
Φυσιολογίας
Ζωϊκών
Οργανισμών



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

‘Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης Ελληνικών ελαιόλαδων διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης σε ανθρώπινη καρκινική σειρά του τραχήλου της μήτρας (HeLa)’



‘Assessment of antioxidant activity of Greek olives with different polyphenolic composition in human cervical cancer cells (HeLa)’

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

***‘Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης Ελληνικών ελαιόλαδων
διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης σε ανθρώπινη
καρκινική σειρά του τραχήλου της μήτρας (HeLa)’***

Δημοπούλου Σοφία

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

***‘Assessment of antioxidant activity of Greek olives with
different polyphenolic composition in human cervical cancer
cells (HeLa)’***

Dimopoulou Sofia

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios
Laboratory of animal physiology

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

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

Χαρουτουγιάν Σέρκος: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, που η μελέτη του μου προσέφερε γνώσεις και εργαστηριακή εμπειρία.

Θα ήθελα, έπειτα, να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Κούκα για την πολύτιμη βοήθεια της, την υπομονετική καθοδήγηση της και την προθυμία της να επιλύσει οποιαδήποτε απορία μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλη την ομάδα του εργαστηρίου φυσιολογίας, οι οποίοι δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

Περιεχόμενα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή	2
Ευχαριστίες	3
Πίνακας Εικόνων	5
Περίληψη	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	9
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	9
1.2.1 Δημιουργία ελευθέρων ριζών	10
1.3 Οξειδωτικό στρες	12
1.3.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες	12
1.4 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	14
1.4.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	15
1.5 Πολυφαινόλες	16
1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών	16
1.5.2 Δράση πολυφαινολών	18
1.6 Το ελαιόλαδο	19
1.6.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου	20
1.6.2 Δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου	22
1.6.3 Υδροξυτυροσώλη-Τυροσώλη	22
2. ΣΚΟΠΟΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιολάδων	24
3.2 Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων	25
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa	26
Διαδικασία Καλλιέργειας	26
3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT	27
3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+	29
3.6 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	30
3.6.1 Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)	30
3.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	32
3.6.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	33

3.6.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA .	35
3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής.....	35
3.8 Στατιστική ανάλυση	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	38
4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	39
4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο XTT.....	40
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής.....	41
4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).....	41
4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
Βιβλιογραφία.....	52

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα .	9
Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια	10
Εικόνα 3: Οξειδωτική Ισορροπία	12
Εικόνα 4: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στον οργανισμό	13
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της δράσης των αντιοξειδωτικών.....	14
Εικόνα 6: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων	14
Εικόνα 7: Κατηγορίες αντιοξειδωτικών	16
Εικόνα 8: Κατηγορίες πολυφαινόλων	17
Εικόνα 9: Κατηγορίες φλαβονοειδών.....	18
Εικόνα 10: Σύσταση ασαπωνοποιήτων και σαπωνοποιήσιμων κλασμάτων ελαιολάδου.	20
Εικόνα 11: Κυριότερες πολυφαινόλες ελαιολάδου	21
Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης	24
Εικόνα 13: Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος (TPF) από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών του	25
Εικόνα 14: Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων HeLa.....	27
Εικόνα 15: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή μορμαζάνη	28
Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του ABTS ^{•-} και αντίδραση εξουδετέρωσης.....	30
Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)	31
Εικόνα 18: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.....	32
Εικόνα 19: Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του	34

Εικόνα 20: Κυτταρομετρία ροής.....	36
Εικόνα 21: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.....	37
Εικόνα 22: Εικόνα από το πηκτώμα αгарόζης για Α) το OLE17, Β) το OLE 38.....	40
Εικόνα 23: Μονοπάτι αποτοξικοποίησης Nrf2.....	49
Εικόνα 24: Μηχανισμοί και δράσεις HT στο κύτταρο.....	50

Πινάκας Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+} ..	38
Διάγραμμα 2: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	39
Διάγραμμα 3: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	39
Διάγραμμα 4: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT.	41
Διάγραμμα 5: Επίδραση εκχυλισμάτων ελαιόλαδου OLE17, OLE38 στα επίπεδα GSH....	41
Διάγραμμα 6: Επίδραση OLE17 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	42
Διάγραμμα 7: Επίδραση OLE38 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa.....	43
Διάγραμμα 8: Επίδραση OLE17 και OLE38 στα επίπεδα ROS.....	44
Διάγραμμα 9: Επίδραση OLE17 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	45
Διάγραμμα 10: Επίδραση OLE38 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa.....	46

Πινάκας πινάκων

Πίνακας 1: Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου.....	26
---	----

Περίληψη

Το ελαιόλαδο, ως κυρίαρχο στοιχείο της μεσογειακής διατροφής είναι εξαιρετικά ωφέλιμο για την υγεία. Έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων μελετών ανά τον κόσμο, με σκοπό να διερευνηθούν οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Η συγκεκριμένη μελέτη εξετάζει την αντιοξειδωτική δράση δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου, διαφορετικής σύστασης. Συγκεκριμένα περιέχουν διαφορετικές ποσότητες από τις δύο κυρίαρχες πολυφαινόλες, την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη. Σκοπός της μελέτης μας είναι να εξεταστεί η συμβολή της διαφορετικής πολυφαινολικής σύστασης Ελληνικών ελαιόλαδων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Στόχος είναι να καταδείξουμε την σημαντικότητα της σύστασης έτσι ώστε να υιοθετηθούν καλύτερες μέθοδοι καλλιεργητικές, επεξεργασίας και παραγωγής ελαιόλαδων. Τελικός σκοπός είναι η μελλοντική παραγωγή ελαιόλαδων υψηλής προστιθέμενης αξίας, αλλά και πιθανών βιολειτουργικών σκευασμάτων, που θα συμβάλλουν στην βελτίωση της υγείας και την αύξηση ζήτησης και αγοράς Ελληνικών τυποποιημένων ελαιόλαδων.

Στη μελέτη έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και DNA προστατευτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, ενώ αξιολογήθηκε και η επίδραση τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (επίπεδα γλουταθειόνης, δραστικών μορφών οξυγόνου) των καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa). Τα αποτελέσματα στο σύνολο τους έδειξαν πως τα δύο πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική και DNA προστατευτική δράση και φάνηκε να βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των HeLa. Στις *in vitro* δοκιμές το εκχύλισμα με την περίσσεια υδροξυτυροσόλης φάνηκε να ασκεί μεγαλύτερη προστατευτική δράση. Ωστόσο, σε επίπεδο κυττάρων φάνηκε πως τα δύο εκχυλίσματα είχαν παρόμοια ικανότητα επαγωγής της γλουταθειόνης.

Abstract

Olive oil, as a predominant element of the Mediterranean diet, is extremely beneficial for health. It has been the subject of many studies around the world in order to investigate its antioxidant properties. This study examines the antioxidant activity of two polyphenolic extracts of olive oil, of different composition. In particular, they contain different amounts of the two major polyphenols, tyrosol and hydroxytyrosol. The aim of our study is to examine the contribution of the different polyphenolic composition of Greek oils of different geographic origin to their antioxidant properties. The aim is to demonstrate the importance of the recommendation to adopt better methods of cultivating, processing and producing oil. The ultimate goal is the future production of high added value olives and possible bio-functional products that will help improve health and increase demand and purchase of Greek standardized oils.

The study evaluated the antioxidant and DNA protective activity of the two extracts, and their effects on redox dynamics (glutathione levels, active forms of oxygen) of cervical cancer cells (HeLa) were evaluated. The results as a whole showed that the two polyphenolic extracts showed antioxidant and DNA protective effect and appeared to improve the reducing state of HeLa. The *in vitro* tests indicate that the extract with the excess of hydroxytyrosol appears to exert a greater protective effect. However, at the cell level it appeared that the two extracts had a similar ability to induce glutathione production.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

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

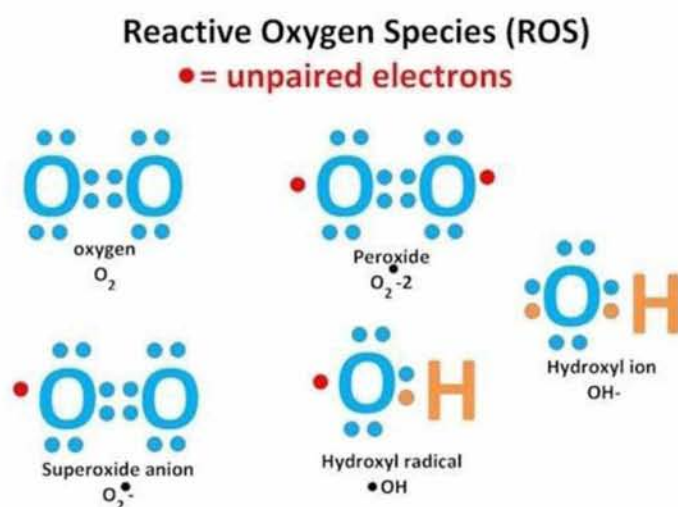
Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών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

Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge, 1990).

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

1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

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



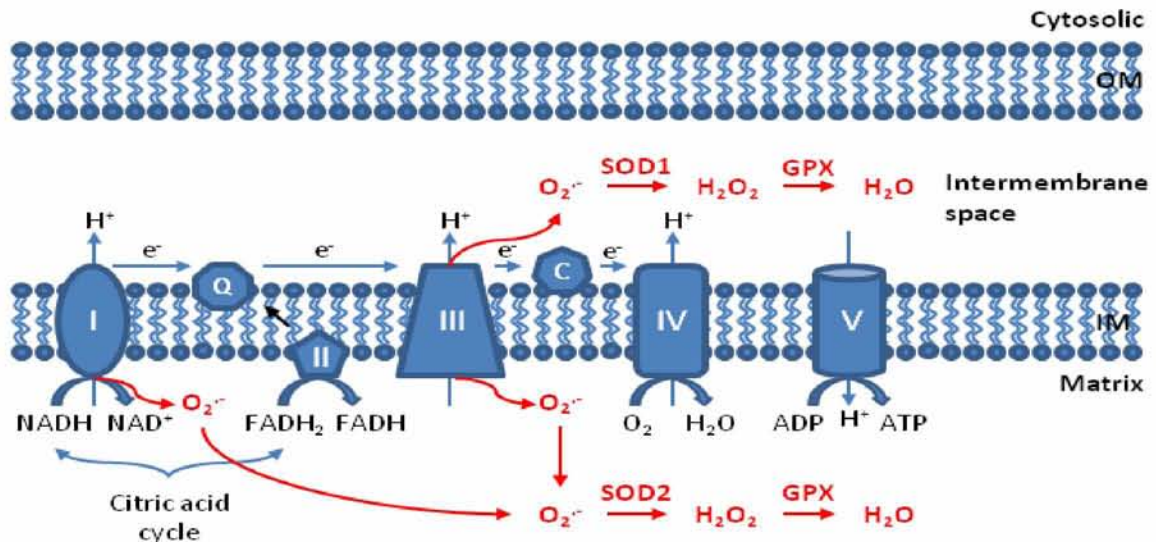
Εικόνα 1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα

1.2.1 Δημιουργία ελεύθερων ριζών

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

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

A) το 90% της παραγωγής ROS γίνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης στα μιτοχόνδρια. Τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινίνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου (Παπαγαλάνης, 2014).



Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

B) Το υπόλοιπο οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα

ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 και το HO^{\cdot} (Παπαγαλάνης, 2014).

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

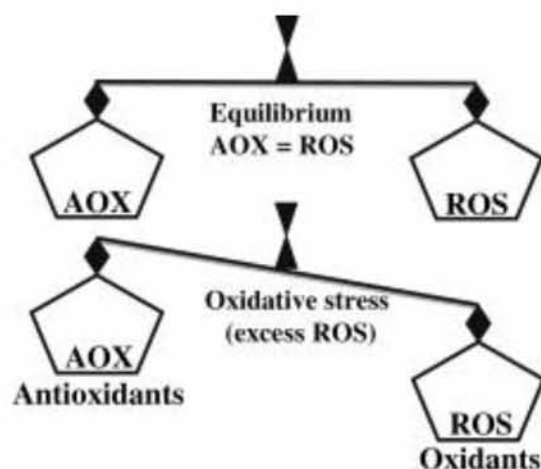
Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα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

Η δημιουργία ROS μπορεί να προκληθεί και από εξωτερικές πηγές (M. Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006):

- **Διατροφή:** Η διατροφή είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες για τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών στον οργανισμό. Πολλά τρόφιμα γρήγορης κατανάλωσης έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και ακόρεστα λιπίδια που οδηγούν στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Επίσης, τρόφιμα που περιέχουν πρόσθετα όπως χρώματα, συντηρητικά ή τεχνητά γλυκαντικά μπορούν επίσης να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών στο σώμα.
- **Χημικά προϊόντα** όπως αυτά που χρησιμοποιούνται για οικιακούς καθαρισμούς, φυτοφάρμακα, καλλυντικά, αρώματα και κρέμες έχουν επίσης βρεθεί ότι προκαλούν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών στο σώμα. Οι χημικές ουσίες (π. X. Φυτοφάρμακα, ψεκάσμοι) που ψεκάζονται στα χωράφια είναι επίσης πηγές σχηματισμού ριζών.
- **Ατμοσφαιρική ρύπανση:** Η ρύπανση, ειδικά αυτή του αέρα, είναι ένας άλλος παράγοντας που οδηγεί στην άνοδο των ελεύθερων ριζών στο σώμα. Ιδιαίτερα ο καπνός από τα τσιγάρα, τις καμινάδες του εργοστασίου και τα αυτοκίνητα μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών.
- **Υπεριώδης ακτινοβολία:** Λόγω της αύξησης των επιπέδων ρύπανσης παγκοσμίως, το στρώμα του όζοντος εξαντλείται. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των επιβλαβών UV ακτίνων που εισέρχονται στην ατμόσφαιρα της γης. Αυτές οι ακτίνες UV μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή ελεύθερων ριζών στο σώμα και έτσι μπορεί να οδηγήσουν σε δερματικές παθήσεις και πρόωρη γήρανση.

1.3 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε ενδεχόμενη βλάβη (Sies, 1997).



Εικόνα 3: Οξειδωτική Ισορροπία

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών. Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση (Espinosa-Diez et al., 2015).

1.3.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

➤ Στα βιομόρια

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα λιπίδια, προσβάλλοντας κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) των κυτταρικών μεμβρανών, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης. Οι ROS μπορούν επίσης να προσβάλλουν πρωτεΐνες, οδηγώντας σε δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop, 2015).

Ακόμα οι ROS δύνανται να αλληλεπιδράσουν και να βλάψουν ακόμα και το DNA, καθώς παρότι αποτελεί ένα σχετικά σταθερό μόριο, μπορούν να δημιουργήσουν τροποποιήσεις στις βάσεις του, προκαλώντας θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών,

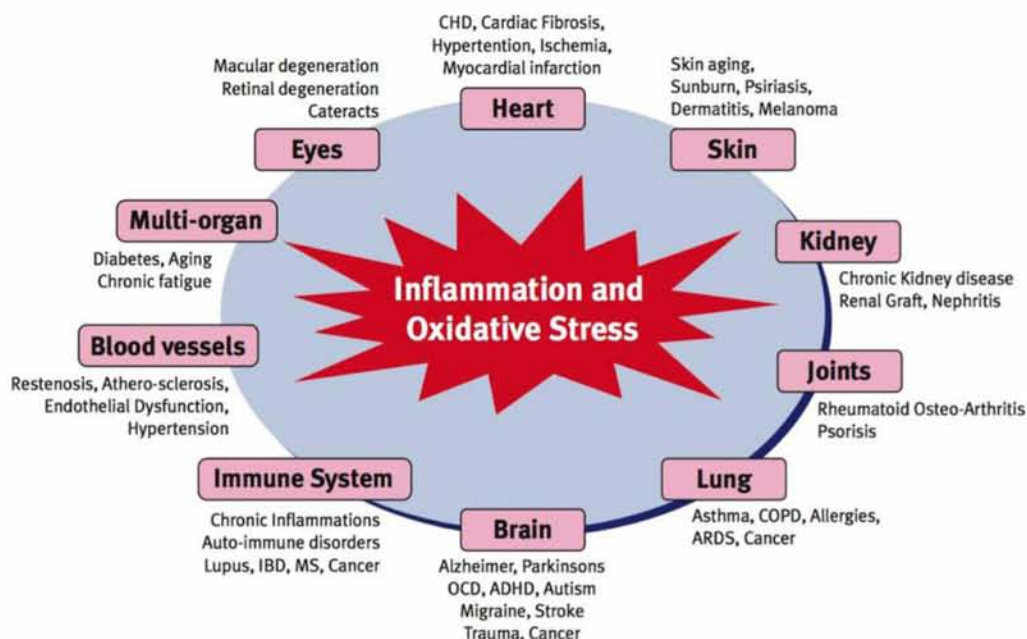
ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Pisoschi & Pop, 2015).

Οξειδωτικές τροποποιήσεις στα νουκλεια οξέα έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή τόσο της αντιγραφής και της μεταγραφής, όσο και της μετάφρασης στη διαδικασία έκφρασης των πρωτεϊνών. Επίσης, προκαλούν μεταλλάξεις, οι οποίες τελικά ενδέχεται να οδηγήσουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων ή ακόμα και στον θάνατο του οργανισμού. (Gill & Tuteja, 2010)

➤ Στον οργανισμό

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler *et al.* 2015).

Σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Marian Valko *et al.*, 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης (Poljsak, 2011).



Εικόνα 4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στον οργανισμό

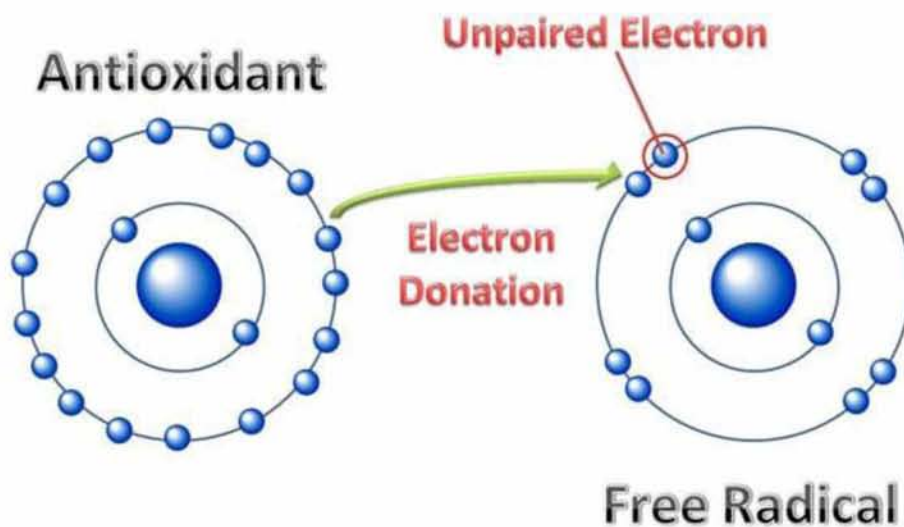
1.4. Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί ως: «κάθε ουσία που, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνη ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως υποδηλώνει αυτός ο ορισμός, είναι αποτρέπουν την πρόκληση ζημιών στα κυτταρικά συστατικά που προκύπτουν ως συνέπεια χημικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες. (Young & Woodside, 2001)



Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση της δράσης των αντιοξειδωτικών

Ένα αντιοξειδωτικό είναι ένα μόριο αρκετά σταθερό ώστε να δωρίζει ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα και να την εξουδετερώνει. (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010)



Εικόνα 6: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

1.4.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

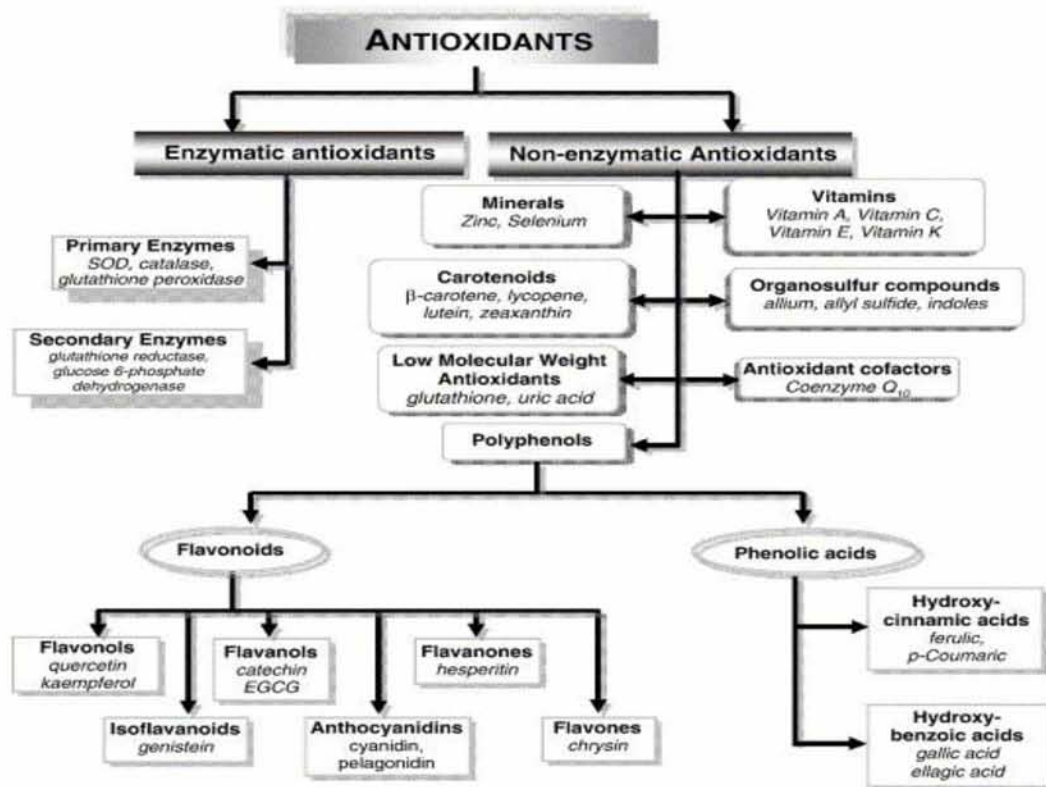
Το σώμα διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες με την παραγωγή αντιοξειδωτικών, είτε δημιουργείται φυσικά επί τόπου (ενδογενή αντιοξειδωτικά), είτε διατίθεται εξωτερικά μέσω τροφών (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Οι ρόλοι των αντιοξειδωτικών είναι να εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών, να προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών.

Ταξινόμηση

Οι ενδογενείς ενώσεις στα κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν ως ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που εμπλέκονται άμεσα στην εξουδετέρωση των ROS και RNS είναι: δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) και αναγωγάση γλουταθειόνης (GRx). Η SOD, η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ελεύθερων ριζών, καταλύει την κατάργηση της ρίζας ανιόντων υπεροξειδίου (O_2^{2-}) στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με αναγωγή. Το σχηματιζόμενο οξειδωτικό (H_2O_2) μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο (O_2) με καταλάση (CAT) ή υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx). Το ένζυμο selenoprotein GPx απομακρύνει το H_2O_2 χρησιμοποιώντας το για να οξειδώσει την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η αναγωγάση της γλουταθειόνης, ένα ένζυμο φλαβοπρωτεΐνης, αναγεννά την GSH από το GSSG, με το NADPH ως πηγή μειωτικής ισχύος. Εκτός από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το GPx μειώνει επίσης τα λιπιδικά ή μη λιπιδικά υδροϋπεροξειδία ενώ οξειδώνει τη γλουταθειόνη (GSH).

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μπορεί να παράγονται από το μεταβολισμό, όπως το λιποϊδικό οξύ, η γλουταθειόνη, η L-αργινίνη, το συνένζυμο Q10, η μελατονίνη, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, οι μεταλλικές πρωτεΐνες, η τρανσφερίνη ή να είναι ενώσεις που δεν μπορούν να παραχθούν στο σώμα και πρέπει να παρέχονται μέσω τροφίμων ή συμπληρωμάτων όπως βιταμίνη E, βιταμίνη C, καρροτενοειδή, ιχνοστοιχεία (σελήνιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρος), φλαβονοειδή, 3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα. (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008)



Εικόνα 7: Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

1.5 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια ομάδα μικρών οργανικών μορίων που συντίθενται από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες.

Στις πολυφαινόλες οφείλεται το χρώμα και γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων (στυφάδα, τραχύτητα) και το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών, καθώς σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al, 2004, Vermeris & Nicholson, 2006, Crozier et al, 2006).

Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al, 2005).

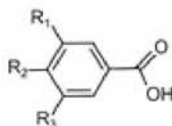
1.5.1 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούνται από φαινολικούς δακτυλίους (C_6H_6O). Η δομική ποικιλομορφία των πολυφαινολών οφείλεται στις διαφορές στη δομή του σκελετού άνθρακα, τα μοτίβα υδροξυλίωσης των φαινολικών δακτυλίων, τη γλυκοσυλίωση, την ακετυλίωση με φαινολικά οξέα και την ύπαρξη στερεοισομερών (Scalbert & Williamson, 2000).

Με βάση τον αριθμό και τη δομή σύνδεσης των φαινολικών ομάδων, οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε τέσσερις κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή, τις λιγνάνες, τα στυλβένια και τα φαινολικά οξέα (Εικόνα 7). Η κάθε ομάδα έχει διαφορετικές φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες (Pandey & Rizvi, 2009).

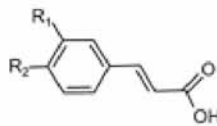
Το κύριο χαρακτηριστικό των φυτικών πολυφαινολών είναι ο βενζοϊκός τους δακτύλιος που συνδέεται με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου.

Hydroxybenzoic acids



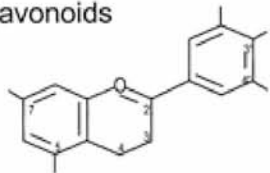
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

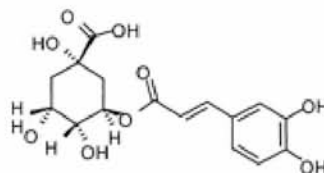


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoids

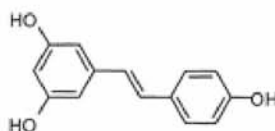


See Figure 2



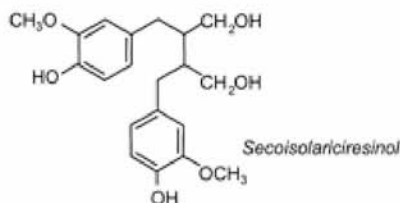
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

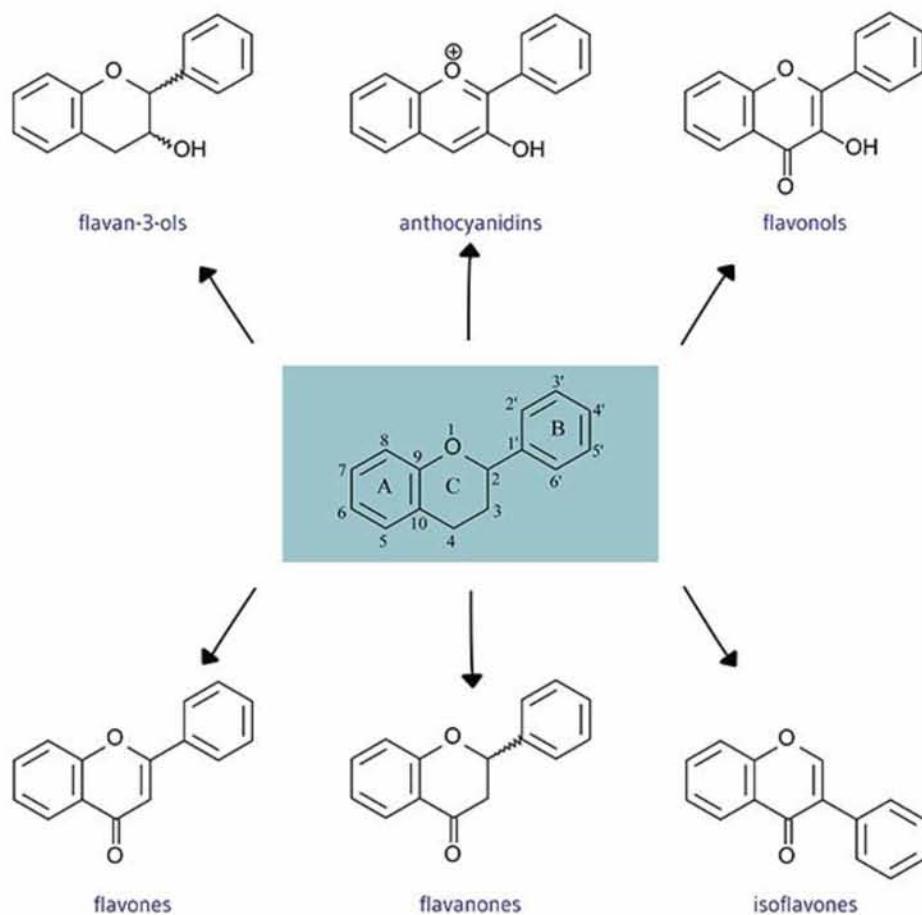
Lignans



Secoisolariciresinol

Εικόνα 8: Κατηγορίες πολυφαινολών

Η μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή έχουν κοινή δομή που αποτελείται από δύο αρωματικούς άνθρακες (Α και Β) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ατόμων άνθρακα τα οποία συνθέτουν ένα ετεροκύκλιο με οξυγόνα. Χωρίζονται εκ νέου σε έξι υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετεροκυκλίου: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόνες, ανθοκυανίνες και φλαβανόλες (Εικόνα 8).



Εικόνα 9: Κατηγορίες φλαβονοειδών

Προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005).

1.5.2 Δράση πολυφαινολών

Ο μηχανισμός δράσης των πολυφαινολών εντοπίζεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ως ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά, μπορούν να προστατεύσουν τα κυτταρικά συστατικά κατά της οξειδωτικής βλάβης και περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο διάφορων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Scalbert et al., 2005).

Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν και αναστέλλουν/διακόπτουν την οξείδωση μέσω ελευθέρων ριζών με 3 τρεις τρόπους (Χίου, 2006):

1. Αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και εξουδετερώνοντας τις. Μέσω αυτής της διαδικασίας μετατρέπονται οι ίδιες σε ελεύθερες ρίζες, οι οποίες όμως είναι πιο σταθερές ακριβώς λόγω της

πολυφαινολικής δομής, η οποία μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά.

2. Δρουν ως δεσμευτές μεταλλικών ιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al, τα οποία συχνά είναι προκαλούν αντιδράσεις οξείδωσης. Αυτό γίνεται μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου με το μεταλλικό ιόν.
3. Αναγεννούν ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, τη βιταμίνη E.

Οι πολυφαινόλες βρέθηκαν ότι μειώνουν τη θνησιμότητα και επιβραδύνουν την πρόοδο καρδιαγγειακών, νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς και διαφόρων τύπων καρκίνου. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες των φυτών έχουν αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργικά, αντιθρομβωτικά και αντιμεταλλαξιγόνα αποτελέσματα. (Gorzynik-Debicka et al., 2018)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών, αποτελεί πρόσθετο πλεονέκτημα τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode & Dong, 2006).

1.6 Το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται ως το έλαιο, που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea* L.) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 71, παράγραφος 1).

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου και η Ευρωπαϊκή Ένωση με αποφάσεις τους που βασίζονται σε ορισμένα κριτήρια και χαρακτηριστικά, κατατάσσουν το ελαιόλαδο σε διάφορες κατηγορίες. Σύμφωνα με τους κανονισμούς, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες ελαιόλαδου:

1. Παρθένο ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του εφαρμόζονται συνθήκες, ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα του. Το ελαιόλαδο της κατηγορίας αυτής δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πέραν της πλύσης, μετάγγισης, φυγοκέντρισης και διήθησης. Στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται τα εστεροποιημένα ελαιόλαδα, μείγματα άλλων λαδιών, ούτε αυτά τα οποία εκχυλίζονται με διαλύτη. Το παρθένο ελαιόλαδο περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

1α. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (extra virgin olive oil)

Είναι το παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 0.8%.

1β. Παρθένο ελαιόλαδο (virgin olive oil)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 2%.

1γ. Ελαιόλαδο Λαμπάντε (virgin olive oil lampante)

Είναι παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, που υπερβαίνει το 2%. Το ελαιόλαδο λαμπάντε είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.

2. Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται μετά από ραφινάρισμα παρθένων ελαιόλαδων και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν είναι δυνατό να υπερβαίνει τα 0,3g ανά 100g ελαιόλαδου, ενώ παράλληλα δεν έχει υποστεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων.

1.6.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Τα συστατικά του ελαιολάδου διακρίνονται σε σαπωνοποιήσιμα, με κύριο συστατικό τις τριακυλογλυκερόλες καθώς και φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α. και μη σαπωνοποιήσιμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α.) (Εικόνα 9). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι αν και το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά πολύ μικρότερο, τα συστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό και βιολογικό ρόλο (Boskou et al. 2006).



Unsaponifiable fraction
Hydrocarbons
Pigments
Volatile compounds
Sterols
Aliphatic alcohols
Phenolic compounds
Triterpene alcohols
Non-glyceride esters and waxes
Saponifiable fraction
Stearic acid
Palmitic acid
Linoleic acid
Miristic acid
Oleic acid
Palmitoleic acid

Εικόνα 10: Σύσταση ασαπωνοποιήτων και σαπωνοποιήσιμων κλασμάτων ελαιολάδου.

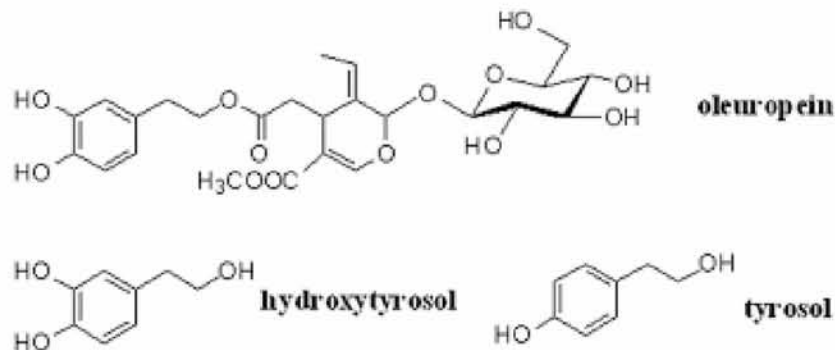
1. 6. 1. A Φαινόλες ελαιολαδου

Το φαινολικό κλάσμα του παρθένου ελαιολάδου είναι ετερογενές, με τουλάχιστον 36 δομικά διακριτές φαινολικές ενώσεις. Η διαφοροποίηση της φαινολικής συγκέντρωσης μεταξύ των διαφόρων παρθένων ελαιολάδων οφείλεται σε παράγοντες όπως: η ποικιλία του ελαιόδεντρου, η περιοχή στην οποία καλλιεργούνται οι καρποί της ελιάς, οι γεωργικές τεχνικές καλλιέργειας των ελαιώνων, η ωριμότητα των ελαιώνων κατά τη συγκομιδή και η επεξεργασία, η μέθοδος αποθήκευσης και ο χρόνος από τη συγκομιδή του ελαιολάδου (Cicerale, Lucas, & Keast, 2010)

Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της ελιάς είναι κυρίως γλυκοζίτες σεκοϊριδοειδών ενώσεων (όπως η ελαιοευρωπαϊνή και ο λιγκστροζίτης), φλαβονών (γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονολών (ρουτίνη), ελενολικού οξέος και του βερμπασκοζίτη (παράγωγο του καφεϊκού οξέος) (Amiot et al. 1989; Ryan et al. 2002) και εντοπίζονται σε όλα τα τμήματα των φυτών από τις ρίζες και τα στελέχη μέχρι τα φύλλα και τους καρπούς.

Με την ωρίμανση του καρπού και την αύξηση της υδρολυτικής δράσης, αυξάνονται οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη) (Gómez-Rico et al. 2008), καθώς προκύπτουν από υδρόλυση της ελευρωπαινης.

Περίπου το 50% της φαινολικής περιεκτικότητας αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη (HT) και τα παράγωγά της.



Εικόνα 11: Κυριότερες πολυφαινόλες ελαιολαδου

1.6. 1. B Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών ελαιολαδου

Η βιοδιαθεσιμότητα μίας ένωσης αναφέρεται στον βαθμό στον οποίο εκχυλίζεται από μια τροφική μήτρα και απορροφάται από το σώμα. Έρευνες έχουν δείξει ότι όπως όλες οι φαινολικές ενώσεις, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη απορροφούνται μετά την κατάποση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Visioli et al., 2000).

Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου παραμένει ασαφής. Εντούτοις, οι διαφορετικές πολικότητες των διαφόρων φαινολικών έχουν θεωρηθεί ότι παίζουν ένα ρόλο στην απορρόφηση αυτών των ενώσεων. Για παράδειγμα, η φαινολική τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη είναι

πολικές ενώσεις και η απορρόφηση τους πιστεύεται ότι συμβαίνει μέσω παθητικής διάχυσης (Manna et al., 2000).

Ο μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου είναι σημαντικός για τον προσδιορισμό της διαθεσιμότητάς τους. Αν τα φαινολικά διασπαστούν και μετατραπούν σε άλλα φαινολικά, αυτό μπορεί να έχει αξιοσημείωτη επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα τους. Οι φαινολικές ενώσεις, το γλυκοσίδιο της ελευρωπαΐνης και η ελευρωπαΐνη και οι προσκολλητικές-αγλυκόνες μετατρέπονται σε υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη και εκκρίνονται στα ούρα. Η ίδια η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη συνδέονται με το γλυκουρονικό οξύ και εκκρίνονται στα ούρα ως γλυκουρονίδια. (Cicerale et al., 2010). Συγκεκριμένα, μελέτη έδειξε ότι το 98% της ΗΤ υπάρχει στο πλάσμα και στα ούρα σε συζευγμένες μορφές, κυρίως σε γλυκουρονικά συζεύγματα, γεγονός που υποδηλώνει εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτου σταδίου μέσω της εντερικής / ηπατικής οδού (Miro-Casas et al., 2003).

Μελέτες σε ανθρώπους υποστηρίζουν ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου έχουν πολύ καλή βιοδιαθεσιμότητα, γεγονός που συμβαδίζει με την αποτελεσματική τους αντιοξειδωτική δράση (Kountouri, Mylona, Kaliora, & Andrikopoulos, 2007).

1.6.2 Δράση των πολυφαινολών του ελαιολάδου

Μελέτες (in vivo και in vitro) έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου επιδρούν θετικά σε ορισμένες παραμέτρους όπως οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, η οξειδωτική βλάβη, φλεγμονώδεις δείκτες, αιμοπεταλιακή και κυτταρική λειτουργία, αντιμικροβιακή δράση και υγεία των οστών. (Cicerale et al., 2010)

Ειδικότερα, μελέτη σε ζωικά μοντέλα έδειξε ότι η διαίτα πλούσια σε πολυφαινόλες ελαιολάδου μειώνει το οξειδωτικό στρες σε κύτταρα της καρδιάς των ποντικών μέσω της επαγωγής του μονοπατιού Nrf2 (Bayram et al., 2012).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή επιτροπή ασφάλειας τροφίμων (EFSA), υπάρχει σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ της πρόσληψης φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου (τυποποιημένων για την περιεκτικότητα σε τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη (ΗΤ) και παράγωγα αυτών) και της προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες. Προκειμένου να επιτευχθούν αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα, Η EFSA καθόρισε ελάχιστη απαίτηση ημερήσιας πρόσληψης 5 mg ΗΤ και των παραγώγων της (Sacchi, Paduano, Savarese, Vitaglione, & Fogliano, 2014)

1.6.3 Υδροξυτυροσόλη-Τυροσόλη

Η **υδροξυτυροσόλη** (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη) είναι μια φυσική πολυφαινόλη που απαντάται σε επιτραπέζιες ελιές και άλλα διαιτητικά φυτά, βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση είτε σε ελεύθερη είτε σε εστεροποιημένη μορφή σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα (EVOO), όπου αντιπροσωπεύει μέχρι 70% -80 % των συνολικών φαινολικών κλασμάτων. Η αφθονία της ΗΤ και των εστέρων της στα

ελαιόλαδα έχει προταθεί ότι συνδέεται με τα οφέλη της μεσογειακής διατροφής για την υγεία (Miro-Casas et al., 2003).

Η υδροξυτυροσόλη έχει λάβει αυξημένη προσοχή λόγω των πολλαπλών φαρμακολογικών δραστηριοτήτων του όπως είναι η αντιοξειδωτική δράση, η αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων και η επαγωγή απόπτωσης και η προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις. Η αντιοξειδωτική της δράση συνίσταται κατά βάση στη εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών όσο και στην επαγωγή του μονοπατιού του Nrf2 (Peng, Zhang, Yao, Duan, & Fang, 2015). Μπορεί επίσης να προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες μέσω του σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με το σίδηρο (Kitsati, Mantzaris, & Galaris, 2016) και μέσω της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής βιογένεσης (Zhu et al., 2010).

Η **τυροσόλη** (4-υδρόξυφαίνυλο αιθανόλη) είναι η δεύτερη φαινολική ένωση που μελετάται σε αυτή την εργασία. Βρίσκεται στο ελαιόλαδο και προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκοζίτη λιγκστροσίδη. Πειράματα για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής της δράσης έχουν δείξει ότι κατά βάση είναι ασθενέστερη σε σύγκριση με την υδροξυτυροσόλη και η ασθενέστερη αντιοξειδωτική ικανότητα της πιστεύεται ότι οφείλεται στην απουσία της ορθο-διφαινολικής ομάδας στη χημική της δομή (Martinez-Huelamo et al., 2017). Παρά τη μειωμένη αντιοξειδωτική της ισχύ, αρκετά πειράματα έχουν επικεντρωθεί στις βιολογικές της δράσεις και έχει αποδειχθεί η προστασία, που προσφέρει από πολλές παθολογικές καταστάσεις (Martinez-Huelamo et al., 2017). Έρευνες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι Nrf2 ενεργοποιείται από την τυροσόλη σε *in vivo* και *in vitro* μοντέλα (Wang et al., 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η συσχέτιση της πολυφαινολικής σύστασης δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου Ελληνικής προέλευσης με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Για την επίτευξη του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν δύο ελαιόλαδα Ελληνικής προέλευσης με διαφορετική πολυφαινολική σύσταση, ένα υπέρ υδροξυτυροσόλης και ένα υπέρ τυροσόλης. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής και της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δυο εκχυλισμάτων, ενώ αξιολογήθηκε και η δράση τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Η συσχέτιση αυτή στοχεύει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων καλλιέργειας, επεξεργασίας και παραγωγής ελαιόλαδων που θα επιφέρει την παραγωγή ελαιολάδων με υψηλή προστιθέμενη αξία. Τελικός σκοπός είναι η παραγωγή ελαιολάδων υψηλότερης ποιότητας, τα οποία θα συμβάλλουν θετικά στην υγεία του ανθρώπου αλλά και θα είναι πιο ανταγωνιστικά στην αγορά.

3. ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

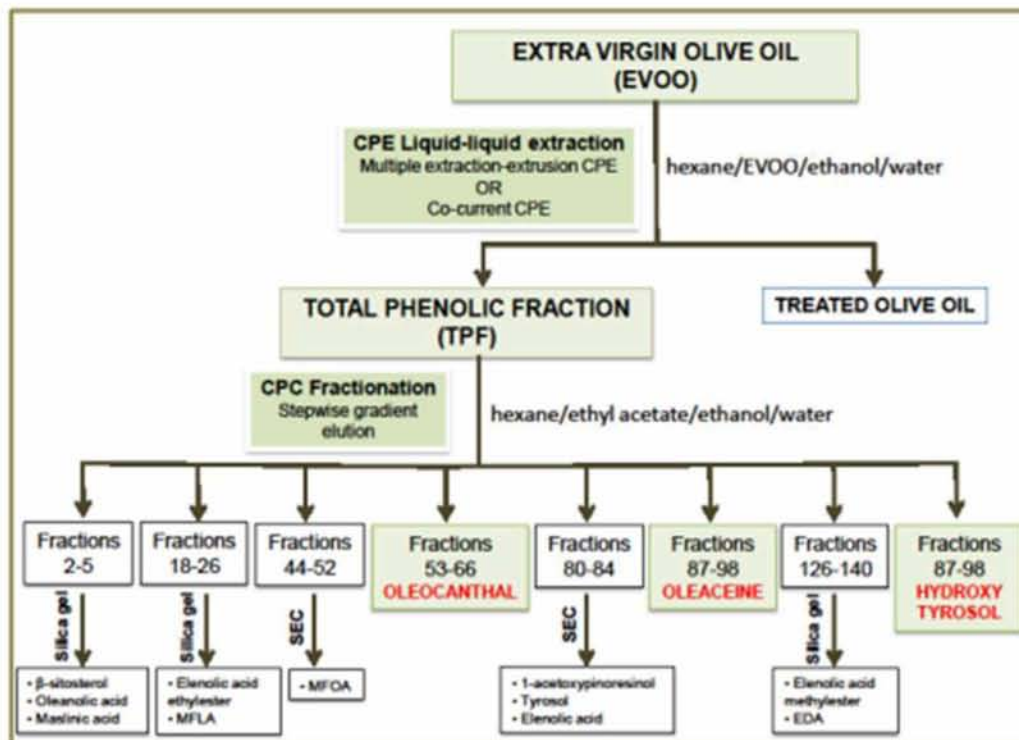
3.1 Πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδων

Τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελαιόλαδου, ήταν ευγενή χορηγία του κύριου Αλέξιου-Λεάνδρου Σκαλτσούνη, Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Φαρμακευτικής, τομέας Φαρμακογνωσίας και χημείας φυσικών προϊόντων. Για την παραλαβή του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPF) από τα ελαιόλαδα, τα δείγματα εκχυλίστηκαν με μέθοδο εκχύλισης την προτεινόμενη από τον IOC (International Olive Council, 2009), με μικρές τροποποιήσεις, ώστε να επιταχυνθεί και να αυτοματοποιηθεί η διαδικασία, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης από φυγοκέντρηση (Centrifugal Liquid-Liquid Extraction - CLLE). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτελείται απομόνωση πολλών φυσικών μεταβολιτών από φυτικά εκχυλίσματα, όπως οι πολυφαινόλες.



Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης

Τα πλεονεκτήματα είναι η ολική ανάκτηση του δείγματος, υψηλή εκλεκτικότητα, υψηλή απόδοση, χαμηλή κατανάλωση διαλύτη, χορήγηση μεγάλων όγκων ελαιόλαδου, ανάκτηση φαινολικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Hamzaoui, Renault, Reynaud, & Hubert, 2013). Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε, για την παραλαβή του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και την απομόνωση των επιμέρους συστατικών του, φαίνεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα και περιγράφεται αναλυτικά σε άλλες μελέτες (Kouka et al., 2017)(Angelis et al., 2017).



Εικόνα 13: Εξαγωγή ολικού πολυφαινολικού κλάσματος (TPF) από το ελαιόλαδο και απομόνωση των επιμέρους συστατικών του

Τα ελαιόλαδα, από τα οποία προέκυψαν τα εκχυλίσματα, ήταν κορωνέικης ποικιλίας και προήλθαν από την περιοχή της Λακωνίας. Για την παραγωγή του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 10 g ελαιόλαδου. Το πρώτο πολυφαινολικό εκχύλισμα, με την κωδική ονομασία OLE 17 περιείχε 2,35 mg παραγώνων υδροξυτυροσόλης και 1,31 mg παραγώνων τυροσόλης. Αντίστοιχα το δεύτερο δείγμα με την κωδική ονομασία OLE 38 περιείχε 0,91 mg παραγώνων υδροξυτυροσόλης και 1,48 mg παραγώνων τυροσόλης. Οι ποσότητες αυτές υπολογίστηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν σε 20 g ελαιόλαδου, ποσότητα, που σύμφωνα με την EFSA, αποτελεί την ελάχιστη ημερήσια πρόσληψη, προκειμένου να επιτευχθούν ευεργετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό.

3.2 Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται η περιεκτικότητα των δύο εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη,

Πίνακας 1: Σύσταση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	mg ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ /20g ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	mg ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ /20g ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΣΥΝΟΛΟ mg (ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ + ΤΥΡΟΣΟΛΗ)
OLE17	2.35	1.31	3.66
OLE38	0.91	1.48	2.39

3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς HeLa

Υλικά καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό:

- Θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966), περιέχει βιταμίνες, αμινοξέα, γλυκόζη, σίδηρο και κόκκινο της φαινόλης.
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed).
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco).
- Fetal Bovine Serum, FBS (Biochrom KG Seromed) ορός βοδινού αίματος.
- Τρυψίνη 0.25% (Gibco), η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κυττάρων της καλλιέργειας.
- PBS, pH 7,3 (Phosphate Buffer Saline 1x) (Gibco), αλατούχο διάλυμα για τη ρύθμιση φωσφορικών, καθώς περιέχει φωσφορικά και ιόντα καλίου, σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου. Χρησιμοποιείται για ξέπλυμα ύστερα από αφαίρεση παλιού θρεπτικού υλικού κατά τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας (split).

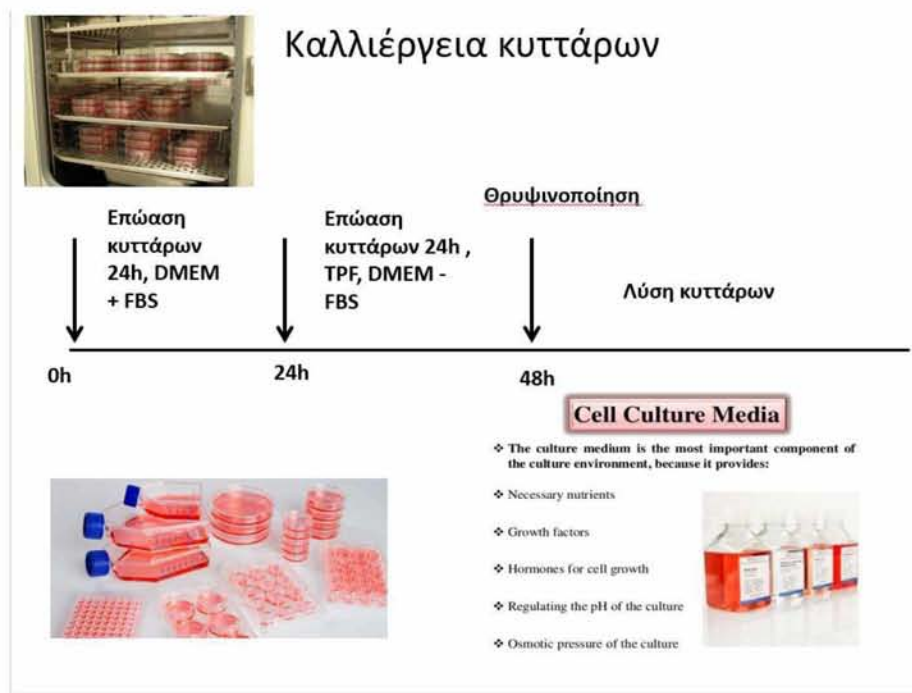
Διαδικασία Καλλιέργειας

Τα καρκινικά κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό 5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης(100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37oC και το CO₂ 5%.

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με αυτά. Τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια τους, με αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με PBS, αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 0,5mL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθεί επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37oC στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar

air flow) με φως, αέρα και UV για αποστείρωση του χώρου εργασίας, όταν δε χρησιμοποιούταν.

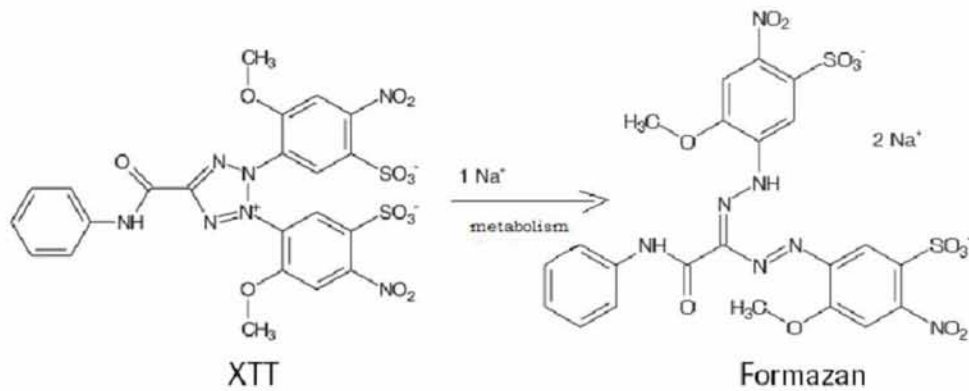
Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες, έπειτα έγινε η χορήγηση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, σε διάφορες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, όπως παρατηρήθηκε με τη μέθοδο XTT, η οποία περιγράφεται παρακάτω, για ακόμα 24 ώρες και έπειτα έγινε θρυψινοποίηση και συλλογή των κυττάρων.



Εικόνα 14: Διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων HeLa

3.4 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση. Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρίας Roche.



Εικόνα 15: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζίνη

Πειραματική Διαδικασία

- Εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70-80% της φιάσκας 25cm², αποκολλώνται από την επιφάνεια της, με τη χρήση τρυψίνης 0,25% και ακολουθεί επαναϊώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS σε falcon. Μέτρηση του αριθμού τους πραγματοποιείται, με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
- Στη συνέχεια, γίνεται επιστροφή 10.000 κύτταρα/θέση σε «πιάτα» 96 θέσεων (96-well plate) και προστίθεται σε αυτά 150μL θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline). Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37⁰C, σε 5% CO₂, προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας.
- Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα δείγματα) συνολικού όγκου 100 μl.
- Επόμενο βήμα είναι η επώαση για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση των 96-well plates και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B, από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Παράλληλα σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης.
- Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).
- Η εξέταση των εκχυλισμάτων έγινε σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Η % αναστολή των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου στην κυτταρική αύξηση της κυτταρικής σειράς HeLa, υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

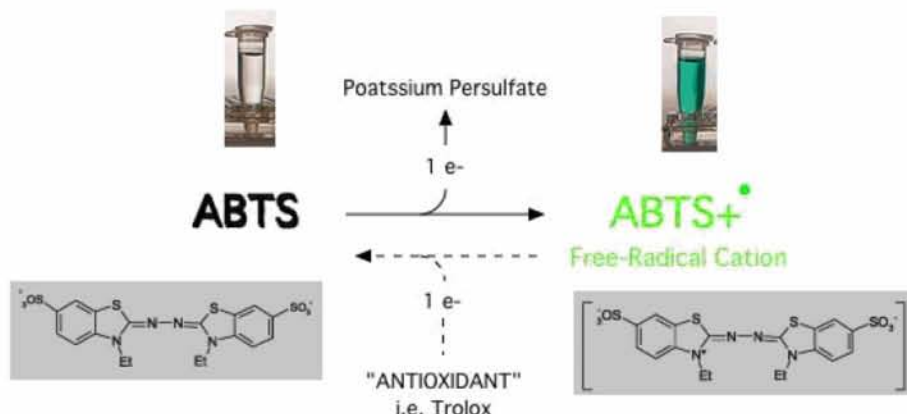
3.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+ (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS•+ είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH•, η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου.

Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH•, η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS•+ πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS•+ και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS•+ για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS. Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδάσων (Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS•+ από την στιγμή που σχηματίζεται είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS•+ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400 μL H₂O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H₂O₂ (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μl των εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H₂O με 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ αποτελούσε το

τυφλό, ώστε να γίνει έλεγχος εάν οι ουσίες στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, εμφάνιζαν απορρόφηση στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 16: Παραγωγή της ρίζας του ABTS^{•+} και αντίδραση εξουδετέρωσης

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_d) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm.

3.6 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

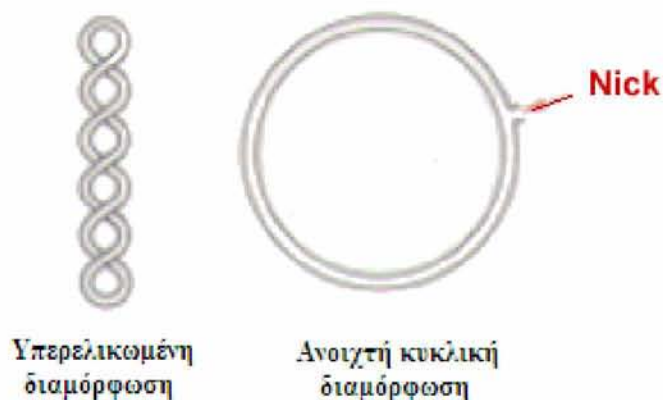
Αντιδραστήρια

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια 2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH), το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNAse) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το διάλυμα H₂O₂ 30% (w/v) αποκτήθηκε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany) και το θρεπτικό μέσο LB broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A

3.6.1. Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA (Plasmid relaxation assay)

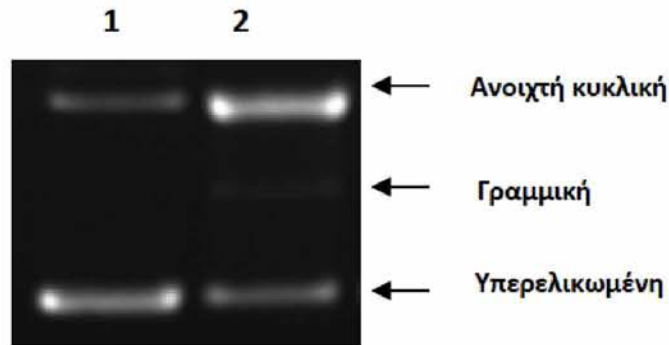
Η μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες) και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται στο ότι το πλασμιδιακό DNA έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του. Οι διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA, λόγω του διαφορετικού τους μεγέθους, έχουν την ιδιότητα να τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση. Οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA είναι οι εξής:

1. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
2. Η ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA.
3. Η γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αгарόζης. Επομένως η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική (Εικόνα 15). Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων (φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών ουσιών) απέναντι στην ικανότητα ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο πλασμιδιακό DNA βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 18: Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (20% ανοιχτή κυκλική και 80% υπερελικωμένη διαμόρφωση). Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (30% ανοιχτή κυκλική, 6% γραμμική και 64% υπερελικωμένη διαμόρφωση).

3.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 μg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές.

Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8, 10 mM EDTA, pH 8) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται πολύ απαλά 4-5 φορές. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 ((100 mL) 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214 g στους 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

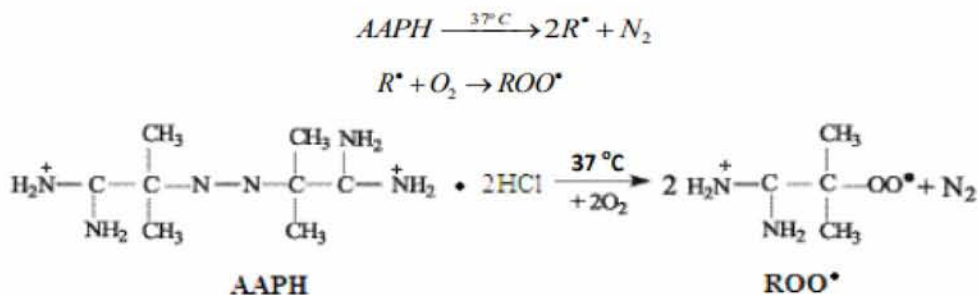
Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται για 20 min

στα 3214 g στους 40C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 40C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, ένζυμο RNase 10 µg/mL).

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torgy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

3.6.3 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001). Με βάση τη μέθοδο, οι ρίζες περοξυλίου ROO• παράγονται από την θερμική διάσπαση της ένωσης AAPH. Οι ενώσεις που έχουν μια αζο-ομάδα όπως η ένωση AAPH χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της λιπιδικής υπεροξειδωσής *in vitro* καθώς οι ρίζες ROO• προσομοιάζουν τις ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και ξεκινούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσής (Niki, 1990). Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό και η χημεία τους ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται. Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO• να ξεκινούν τη λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένη, σε ανοιχτή κυκλική και γραμμική. Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των δειγμάτων στη δράση των ριζών ROO• γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση.



Εικόνα 19: Χημική δομή της ένωσης AAPH και οι αντιδράσεις της θερμικής της διάσπασης και του

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 10 μL . Στο μείγμα της αντίδρασης περιέχονται 1 μg (2 μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 2,5 mM AAPH (4 μL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους 45 min στους 37 °C στο σκοτάδι. Το AAPH προστίθεται λίγο πριν την επώαση. Μετά την επώαση η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μL διαλύματος φόρτωσης (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη). Το δείγμα, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA μόνο του στο ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA μαζί με 2,5 mM AAPH αποτελεί το θετικό μάρτυρα. Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος ή του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8) για 1 h στα 70 V. Στη συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πήκτωματος και ανάλυση της φωτογραφίας. Η δράση του κάθε δείγματος δοκιμάζοταν εις τριπλούν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών ROO[•].

3.6.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης απέναντι στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από τις ρίζες OH• και ROO• εκφράζεται ως το ποσοστό της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η αντιοξειδωτική/προστατευτική δράση των εξεταζόμενων δειγμάτων εκφράζεται ως το ποσοστό αναστολής της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση παρουσία των ριζών σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. Το ποσοστό αναστολής της δράσης των ριζών υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S\theta - S\delta)/(S\theta - S0)] \times 100$$

Sθ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του θετικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA και ρίζες OH• ή ROO•).

Sδ: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του δείγματος (πλασμιδιακό DNA, ρίζες OH• ή ROO• και δείγμα [φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή ένωση]).

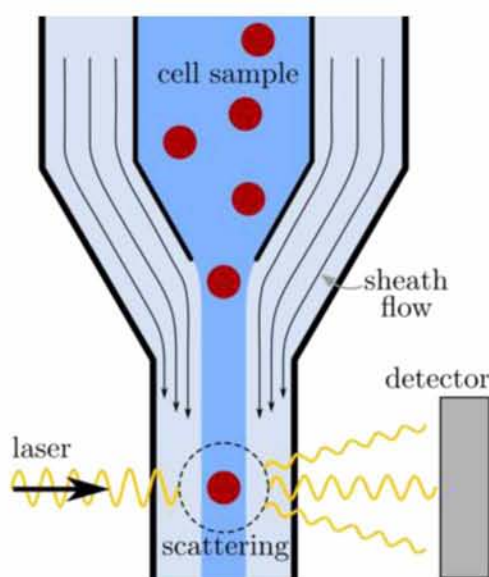
S0: Ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου του αρνητικού μάρτυρα (πλασμιδιακό DNA μόνο του).

Για την σύγκριση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης των δειγμάτων υπολογίστηκε η τιμή IC50. Η τιμή IC50 αποτελεί τη συγκέντρωση του δείγματος που οδηγεί σε 50% αναστολή της δράσης των ριζών OH• ή ROO• (αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA) σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC50 τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του δείγματος απέναντι στις ρίζες OH• ή ROO•.

3.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος, είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε

σωματίδιο μεταξύ 0,2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).



Εικόνα 20: Κυτταρομετρία ροής

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF.



Εικόνα 21 Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

Σε κάθε πείραμα παρασκευάζονται ένα διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και ένα διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150 μl PBS και επωάζονται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15 μl) (40 μM) ή της χρωστικής DCF-DA (15 μl) (10 μM), για τον προσδιορισμό της GSH ή των ROS αντίστοιχα, στο κλίβανο στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί πλύση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 μl PBS και φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250 μl PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με έναν ρυθμό 100-200 γεγονότων/δευτερόλεπτο. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

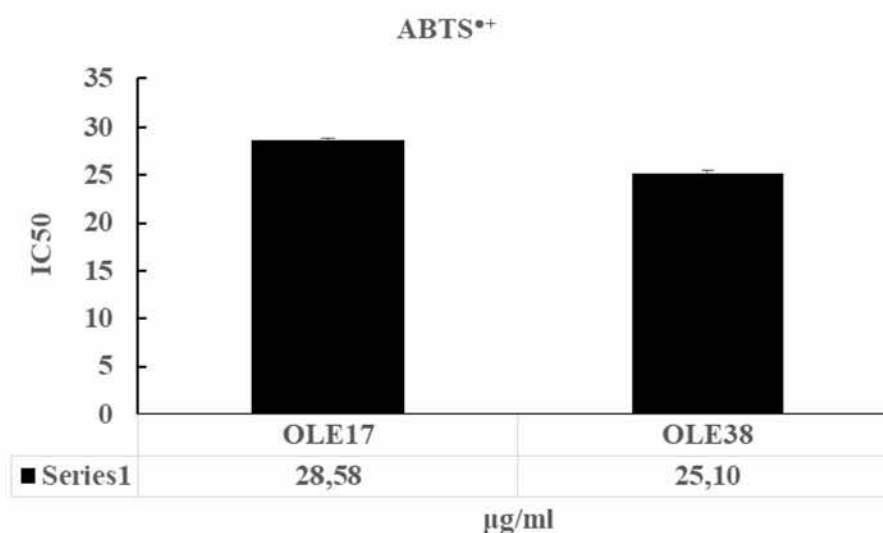
3.8 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) και μέσω μονόδρομης ανάλυσης (One – Way Anova) και το Dunnett test. Οι συγκρίσεις έγιναν κατά ζεύγη. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως \pm standard error of the means (SEM).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}

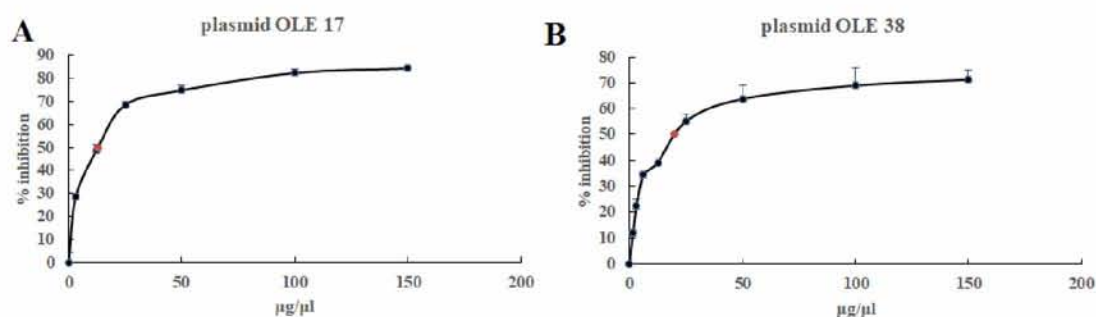
Με τη μέθοδο ABTS^{•+}, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδου, με κωδική ονομασία OLE17 και OLE38. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Το OLE17 είχε IC50 στα 28,58 µg/ml, ενώ το OLE38 είχε IC50 στα 25,10 µg/ml. Τα δύο εκχυλίσματα έχουν ισότιμη αντιοξειδωτική δράση.



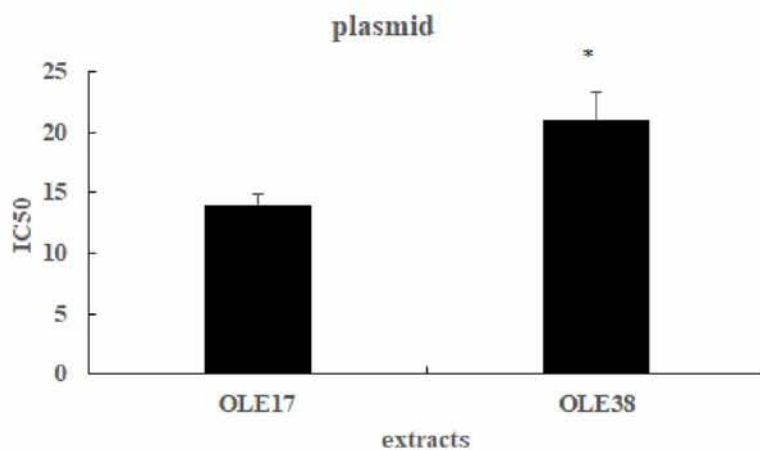
Διάγραμμα 1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων ($p < 0,05$) ($n=3$).

4.2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

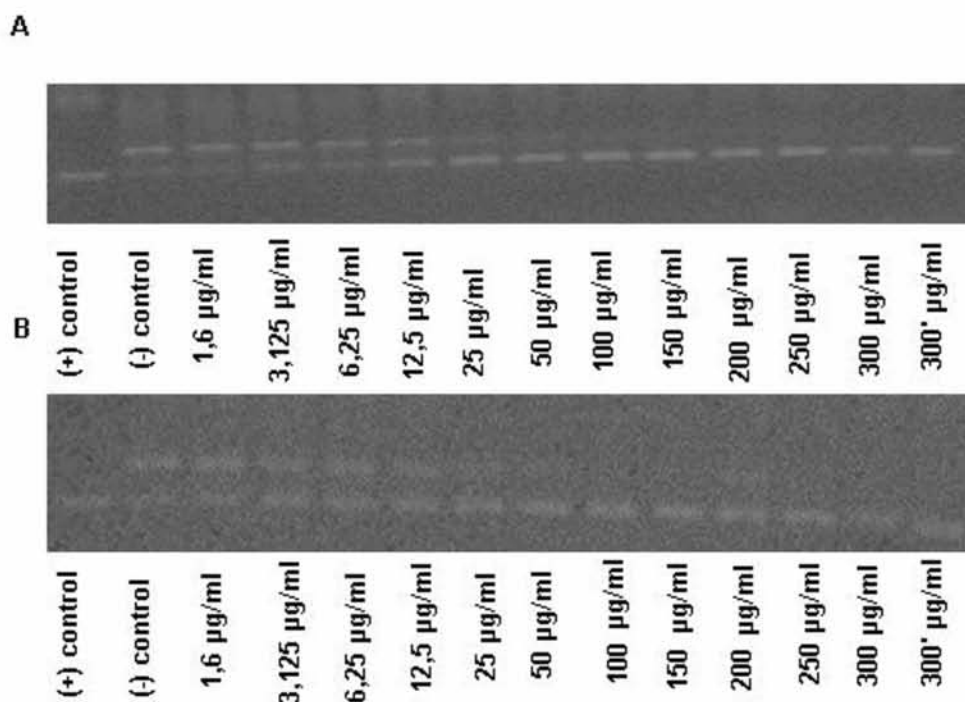
Με την μέθοδο των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA, προσδιορίσαμε την ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιόλαδων (OLE 17, OLE 38), να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO●. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το OLE 17 είχε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA, σε σχέση με το OLE 38, καθώς εμφάνισε IC50 στα 14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ σε αντίθεση με το OLE 38, που εμφάνισε IC50 στα 21 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



Διάγραμμα 2 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Α) OLE 17 IC50 14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Β) OLE 38 IC50 21 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).



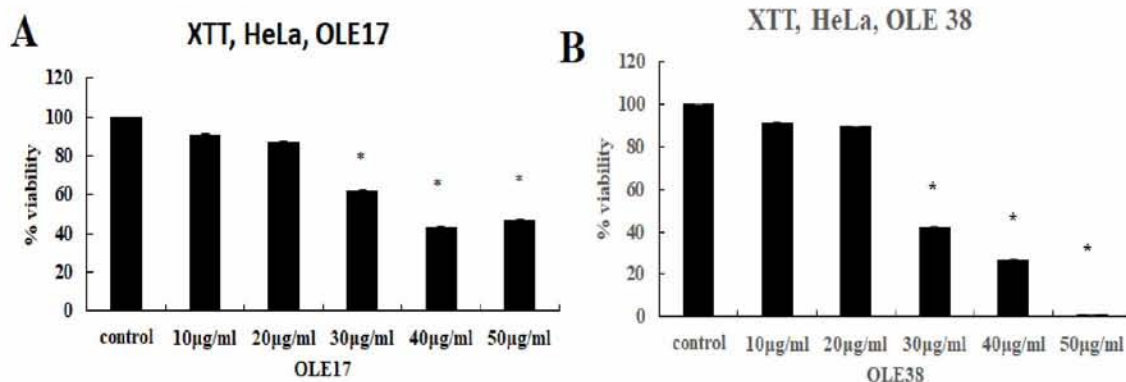
Διάγραμμα 3 Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50 και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων.



Εικόνα 22: Εικόνα από το πήκτωμα αγαρόζης για Α) το OLE17, Β) το OLE 38

4.3 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο ΧΤΤ.

Με την μέθοδο ΧΤΤ έγινε προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Οι μη κυτταροτοξικές χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa), όπου και χορηγήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 10,0-50,0 µg/ml. Ωστόσο συγκεντρώσεις πάνω από 30,0 µg/ml ήταν κυτταροτοξικές και για τα δύο εκχυλίσματα. Ωστόσο φάνηκε μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας στα 30,0 µg/ml OLE38. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής δράσης των δύο εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10,0-25,0 µg/ml OLE17 και 5,0-20,0 µg/ml OLE38.

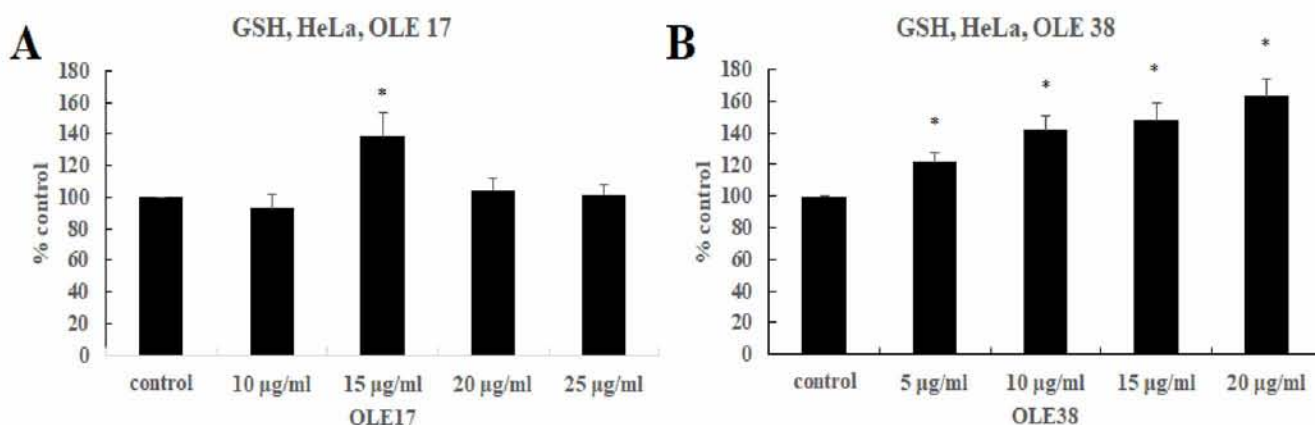


Διάγραμμα 4: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων OLE17, OLE 38, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

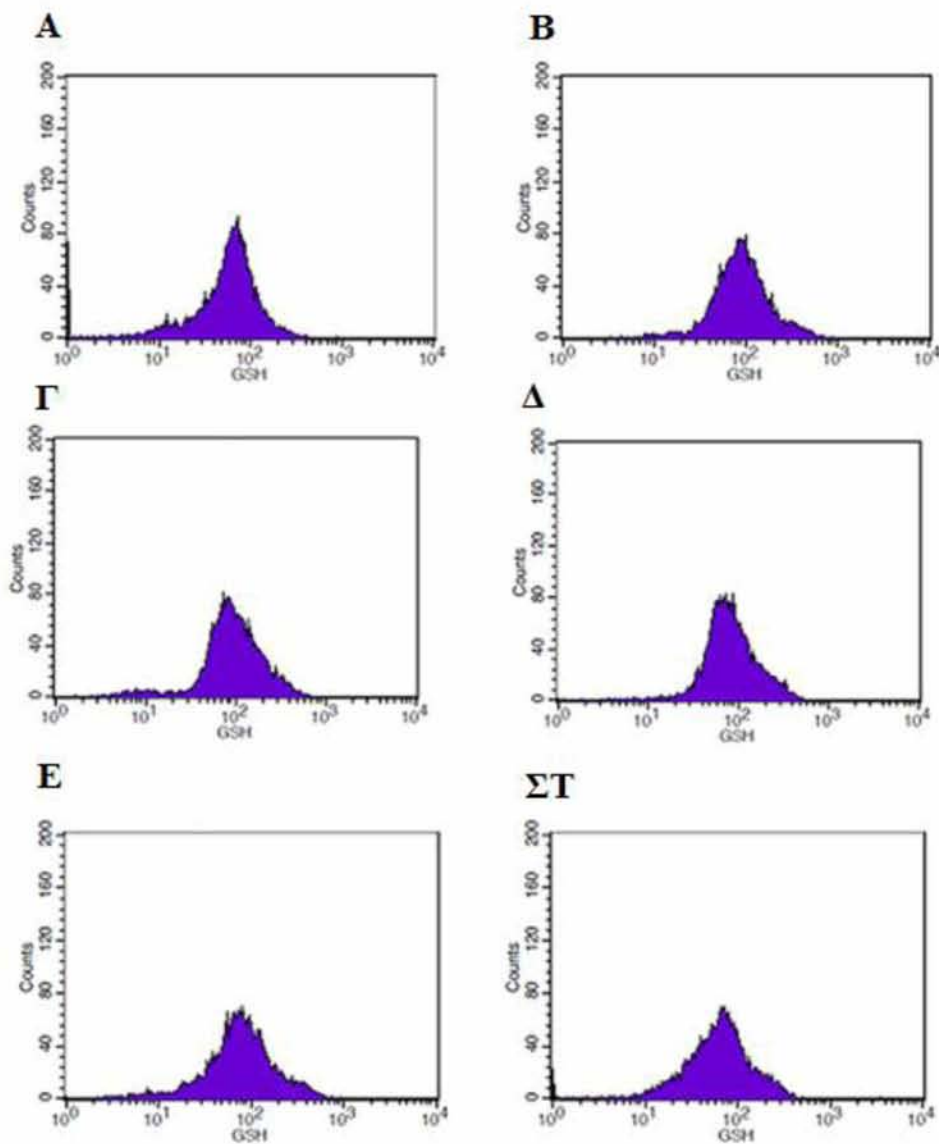
4.4 Προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

4.4.1. Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH).

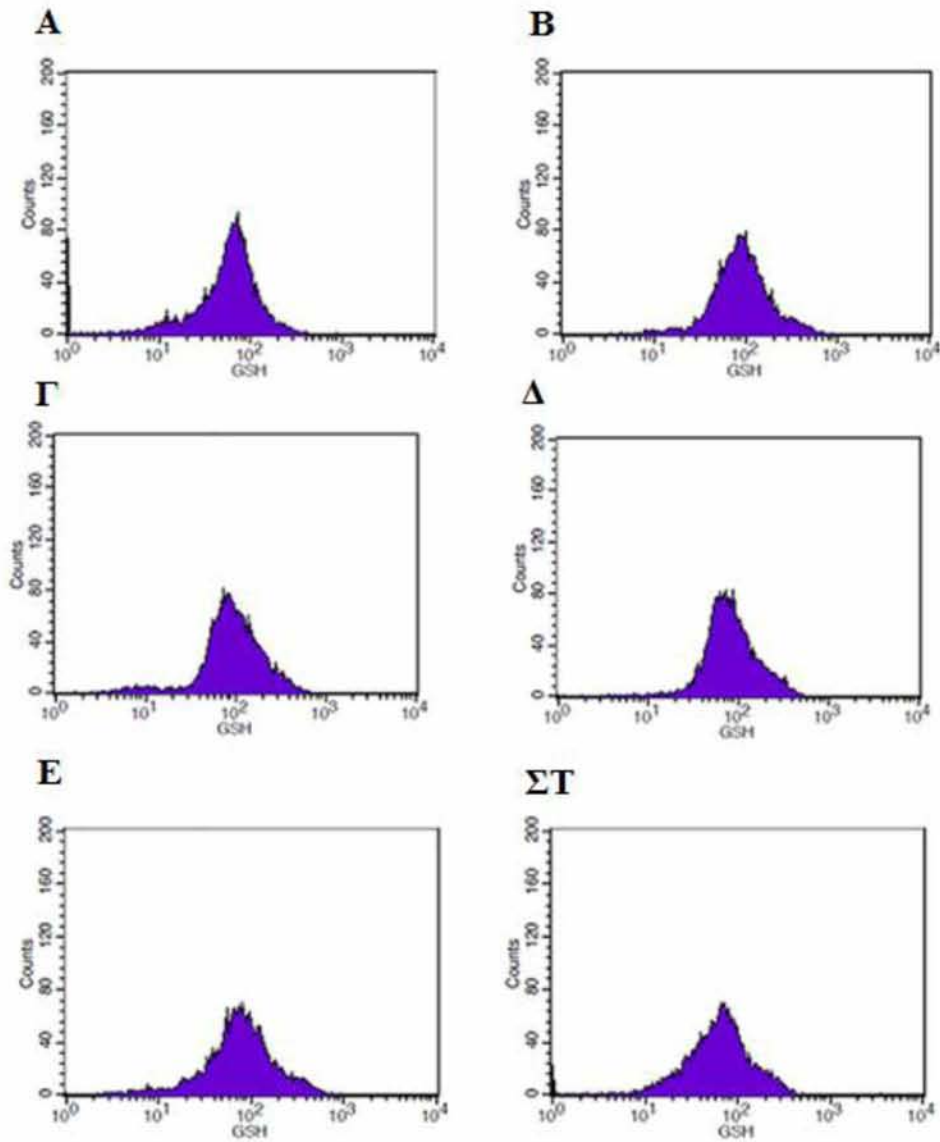
Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν πως το εκχύλισμα OLE17 αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 37% στη συγκέντρωση 15 µg/ml OLE17, σε σύγκριση με το control. Επιπλέον, το εκχύλισμα OLE38, αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$), τα επίπεδα της GSH κατά 22%, 42%, 48% και 63% στις συγκεντρώσεις 5.0, 10.0, 15.0 και 20.0 µg/ml OLE38 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 5: Επίδραση εκχυλισμάτων ελαιόλαδου OLE17, OLE38, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά HeLa, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control



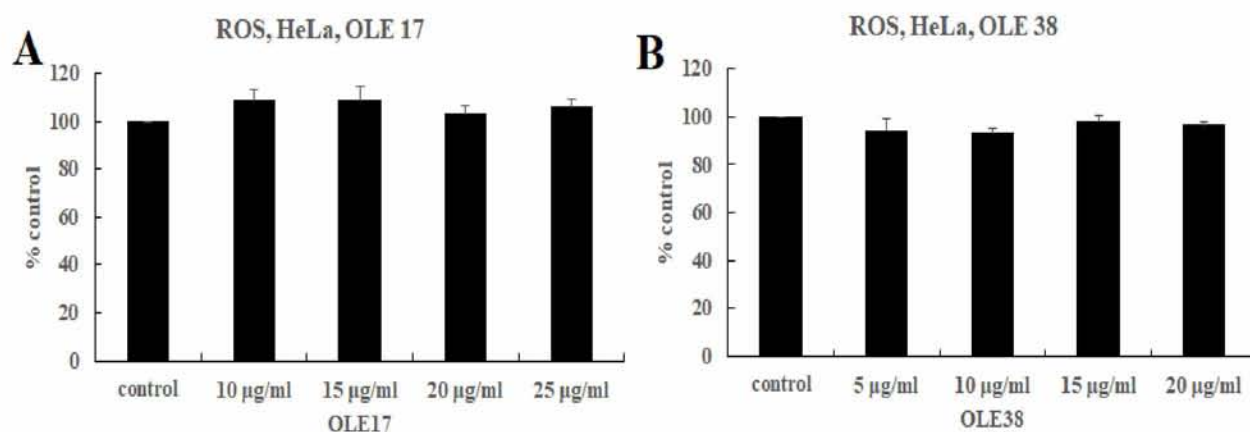
Διάγραμμα 6: Επίδραση OLE17 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE17). Γ) Επίπεδα GSH στα 10 $\mu\text{g/ml}$ OLE17. Δ) Επίπεδα GSH στα 15 $\mu\text{g/ml}$ OLE17. Ε) Επίπεδα GSH στα 20 $\mu\text{g/ml}$ OLE17. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 25 $\mu\text{g/ml}$ OLE17.



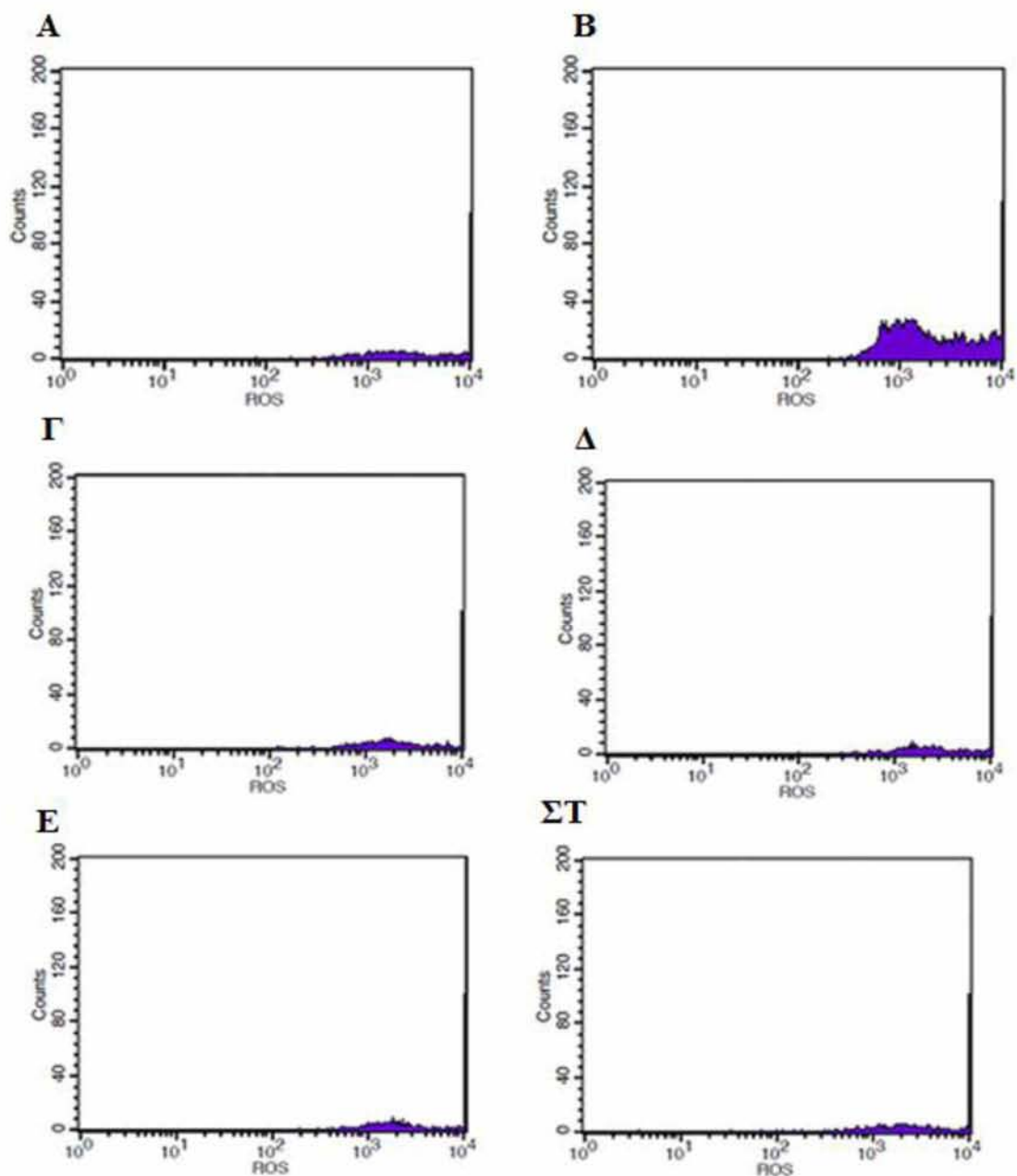
Διάγραμμα 7: Επίδραση OLE38 στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα GSH στα controls (χωρίς OLE38). Γ) Επίπεδα GSH στα 5 µg/ml OLE38. Δ) Επίπεδα GSH στα 10 µg/ml OLE38. Ε) Επίπεδα GSH στα 15 µg/ml OLE38. ΣΤ) Επίπεδα GSH στα 20 µg/ml OLE38.

4.4.2. Επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

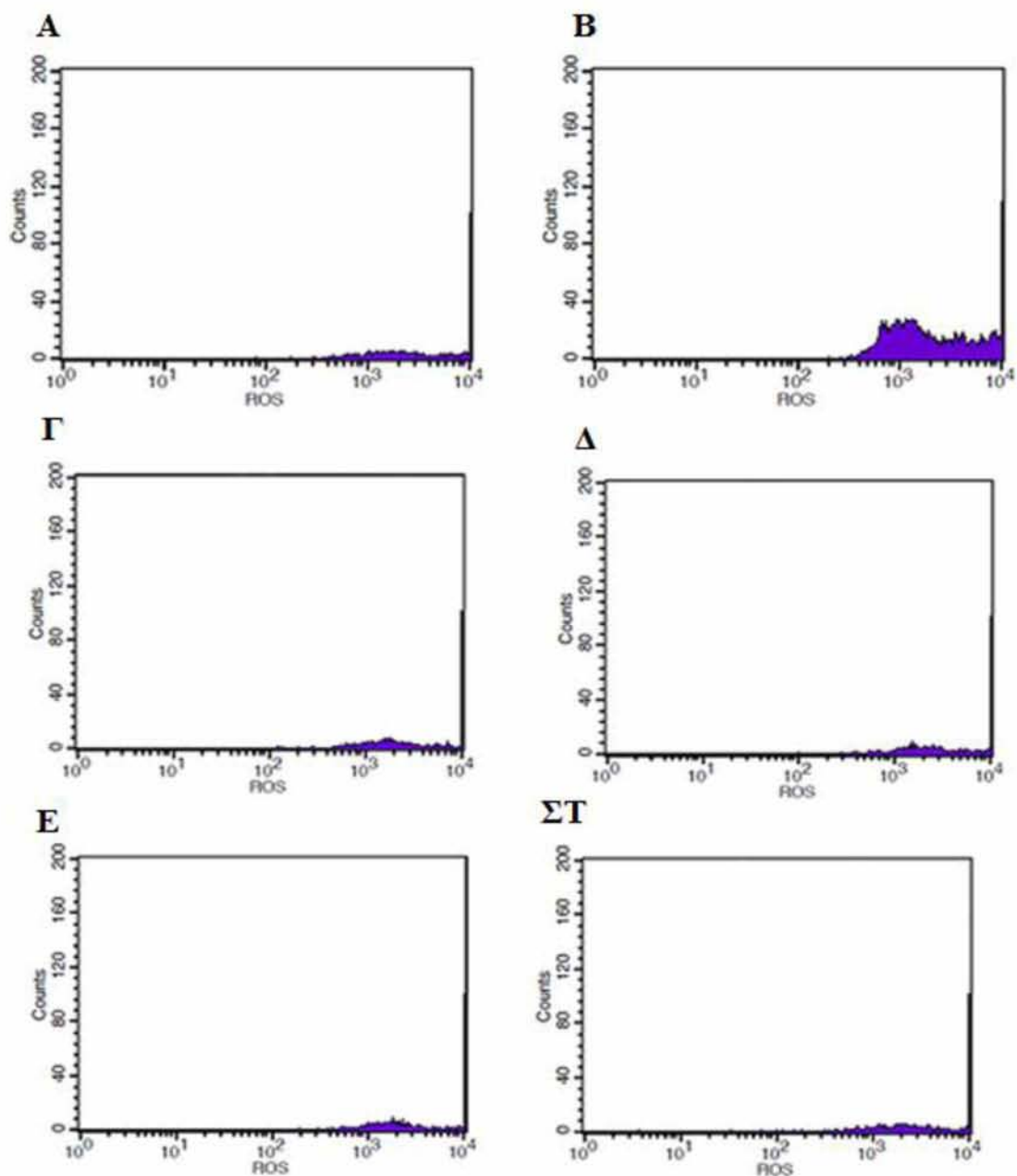
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ROS, σε σύγκριση με το control, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων OLE17 και OLE38.



Διάγραμμα 8: Επίδραση OLE17 και OLE38 στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά HeLa έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 9: Επίδραση OLE17 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς OLE17). Γ) Επίπεδα ROS στα 10 μg/ml OLE17. Δ) Επίπεδα ROS στα 15 μg/ml OLE17. Ε) Επίπεδα ROS στα 20 μg/ml OLE17. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 25 μg/ml OLE17.



Διάγραμμα 10: Επίδραση OLE38 στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά HeLa. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση της GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής. Α και Β) Επίπεδα ROS στα controls (χωρίς OLE38). Γ) Επίπεδα ROS στα 5 $\mu\text{g/ml}$ OLE38. Δ) Επίπεδα ROS στα 10 $\mu\text{g/ml}$ OLE38. Ε) Επίπεδα ROS στα 15 $\mu\text{g/ml}$ OLE38. ΣΤ) Επίπεδα ROS στα 20 $\mu\text{g/ml}$ OLE38.

4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τα οφέλη της μεσογειακής διατροφής στην υγεία. Πράγματι, πολλές μελέτες αποδεικνύουν τις επωφελείς συνέπειες για την υγεία από την κατανάλωση παραδοσιακής μεσογειακής διατροφής, όπως οι μειωμένοι ρυθμοί καρδιαγγειακής νόσου (CVD), η αθηροσκλήρωση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος (Tosti et al., 2018) και σχετίζεται με τη βελτιωμένη νοητική λειτουργία (Martínez-Huélamo, Rodríguez-Morató, Boronat, & de la Torre, 2017). Μεταξύ των συστατικών της μεσογειακής διατροφής, το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) διαδραματίζει βασικό ρόλο. Οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου οφείλονται στη φαινολική του σύνθεση (Tiripoli et al., 2005). Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του EVOO (Cicerale et al., 2010). Οι πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου είναι η υδροξυτυροσώλη (HT) και η τυροσώλη και σε αυτή τη μελέτη εξετάζονται οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και η αντιμεταλλαξογόνος δράση δυο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ελαιολάδου κορωνικής ποικιλίας ελιάς. Αρχικά μελετήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο εξουδετέωσης της ρίζας ABTS•+. Έπειτα, τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Ακόμα η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων αξιολογήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο, με την χρήση της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για να αποφευχθεί η χρήση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων στα πειράματα, η κυτταροτοξικότητά των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με την μέθοδο XTT. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, στην οποία ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Τα δυο εκχυλίσματα, με την κωδική ονομασία OLE 17 και OLE 38 παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση των δύο κυρίαρχων πολυφαινολών και παραγώγων αυτών, της υδροξυτυροσώλης (HT) και της τυροσώλης (T) αντίστοιχα. Το OLE 17 έχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα HT, ενώ το OLE 38 περιέχει 1,6 φορές περισσότερη τυροσώλη. Ωστόσο, η ποσότητα υδροξυτυροσώλης στο OLE 17 είναι 1,6 φορές μεγαλύτερη από το εκχύλισμα OLE 38. Στόχος της μελέτης αυτής είναι να καταδείξει την τον αντίκτυπο της διαφορετικής σύστασης στην αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση των εκχυλισμάτων. Με βάση τη σχέση πολυφαινολικής σύστασης και αντιοξειδωτικής δράσης και γνωρίζοντας ότι η δράση επηρεάζεται από την καλλιέργεια, την ποικιλία και τον τρόπο παραγωγής του ελαιολάδου, αυτή η μελέτη μπορεί να συμβάλει ώστε να υιοθετηθούν καλύτερες μέθοδοι και κατά συνέπεια πιο ποιοτικά ελαιόλαδα.

Περνώντας στην πειραματική διαδικασία, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέθοδος εξουδετέρωσης ρίζας ABTS•+. Στη μέθοδο ABTS, τα δύο πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν μια δοσοεξαρτώμενη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Από τις τιμές IC50 που υπολογίστηκαν προκύπτει ότι τα δύο εκχυλίσματα έχουν σχεδόν ισότιμη αντιοξειδωτική δράση. Το OLE17 είχε IC50 στα 28,58 μg/ml, ενώ το OLE38 είχε IC50 στα 25,10 μg/ml, δηλαδή έχουν την ίδια ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS•+. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς εξηγείται σε άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά του εκχυλίσματος, δηλαδή σε διαφορετική σύσταση πολυφαινολών εκτός από την τυροσόλη και την HT.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, έδειξαν πως το OLE 17 είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα να προστατεύει τη θραύση του DNA σε σχέση με το OLE 38, όπως δηλώνει η τιμή IC50 του OLE 17 που υπολογίστηκε στα 22,5 μg/μl σε αντίθεση με το OLE 38, που εμφάνισε IC50 στα 74 μg/μl. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στη σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα υδροξυτυροσόλης στο OLE17 (2,35 μg/μl) σε σχέση με το OLE38 (0,91 μg/μl) και στη δραστικότητα της υδροξυτυροσόλης στην εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Η δραστικότητα της οφείλεται στη δομή της, η οποία έχει ένα παραπάνω υδροξύλιο στο φαινολικό της δακτύλιο. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν την ικανότητα της HT να προστατεύει το DNA από θραύσεις λόγω οξειδωτικής βλάβης. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε HepG2 κύτταρα στα οποία προστέθηκε οξειδωτικός παράγοντας OPP, φάνηκε ότι η επώαση με HT μείωσε σημαντικά τις θραύσεις στις αλυσίδες του DNA (Li J et al. , 2012). Επίσης, έρευνα σε HaCaT που επώαστηκαν με HT έδειξε ότι η HT μείωσε σημαντικά τις θραύσεις των κλώνων DNA που προκαλούνται από την UVB (Guo, An, Jiang, Geng, & Zhong, 2010). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε κυτταρικές σειρές μαστού (MCF7, MDA-MB-231 και MCF10A)(Warleta et al., 2011).

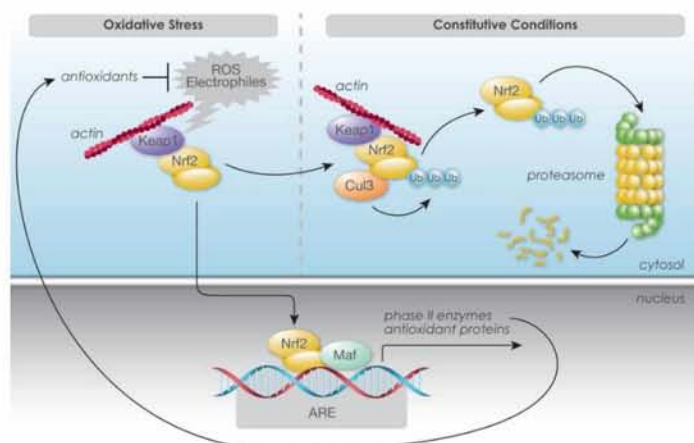
Έπειτα, τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT για τον προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων έδειξαν πως κυτταροτοξικότητα εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις πάνω από 30μg/ml και για τα δύο εκχυλίσματα. Συνεπώς, για τον έλεγχο τις αντιοξειδωτικής τους δράσης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10,0-25,0 μg/ml στο OLE17 και 5,0-20,0 μg/ml στο OLE38. Τα ανωτέρα όρια των συγκεντρώσεων επιλέχθηκαν διότι το εκχύλισμα OLE38 παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στα 30 μg/ml και στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Μέσω της κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και των ROS, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, σε καρκινικά κύτταρα HeLa.

Η GSH είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Οι αναγωγικές τις ιδιότητες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων (Aquilano, Baldelli, & Ciriolo, 2014)

Η κυτταρομέτρία ροής έδειξε ότι και τα δύο πολυφαινολικά εκχυλίσματα προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH. Το εκχύλισμα OLE17 αύξησε κατά 37% τα επίπεδα της GSH στη συγκέντρωση 15 μg/ml, ενώ το εκχύλισμα OLE38 αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH στις συγκεντρώσεις 5.0, 10.0, 15.0 και 20.0 μg/ml κατά 22%, 42%, 48% και 63% αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Αυτή η διαφορά στα επίπεδα GSH ίσως οφείλεται στον κυτταρικό μεταβολισμό, που επηρεάζει τη δραστηριότητα των δυο εκχυλισμάτων.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που προκαλούν αύξηση των επιπέδων GSH είναι οι εξής: (i) αύξηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση GSH (γ-γλουταμινοκυστεϊνική λιγάση και συνθετάση γλουταθειόνης) (ii) περίσσεια GSH από την αντίδραση της με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα την άμεση εξουδετέρωσή τους, (iii) αύξηση της δραστηριότητας της ρεδοκτάσης γλουταθειόνης (GR), η οποία αναγεννά την GSH από την οξειδωμένη της μορφή, GSSG (Papadopoulou et al., 2017), iv) ενεργοποίηση του μονοπατιού αποτοξικοποίησης του Nrf2 (Suzuki et al., 2016).



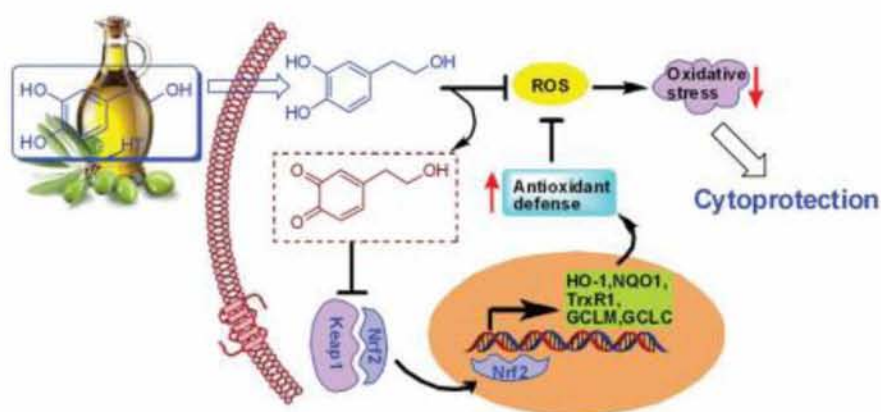
Εικόνα 23 Μονοπάτι αποτοξικοποίησης Nrf2

Ο Nrf2 είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιεί μια συστοιχία κυτταροπροστατευτικών γονιδίων μέσω των αλληλουχιών ARE (Antioxidant Response Elements) και συμμετέχει στην αντιοξειδωτική αντίδραση. Όπως φαίνεται στην εικόνα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 βρίσκεται συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) και διατηρείται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα. Η Keap1 είναι υποδοχέας ηλεκτρόφιλων ενώσεων, ο οποίος επάγει την ουβικιτινίωση του Nrf2 και την αποικοδόμησή του στο 26 S πρωτεάσωμα. Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες, ο Keap1 αποσυνδέεται από τον Nrf2 και η αποικοδόμησή του σταματά. Έτσι ο Nrf2 σταθεροποιείται και οδηγείται στον πυρήνα, όπου σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με μία

από τις μικρές Maf πρωτεΐνες. Το ετεροδιμερές συνδέεται στις περιοχές ARE του DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική απόκριση. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων φάσης II με χαρακτηριστικά την υπεροξειδάση γλουταθειόνης, θειορεδοξίνη, αναγωγάση θειορεδοξίνης, υπεροξυρεδοξίνη, 6-φωσφορική αφυδρογονάση, S-τρανσφεράση γλουταθειόνης (GST). (Martínez-Huélamo et al., 2017) . Από την ενεργοποίηση του μονοπατιού του Nrf2 παράγεται μεταξύ άλλων και η GSH (Suzuki et al., 2016).

Η ικανότητα της HT να επάγει τον Nrf2 έχει υποστηριχτεί και από άλλες έρευνες. μία μελέτη σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (VECs) που επώαστηκαν με HT έδειξε ότι αυτή οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης του Nrf2 καθώς και στην αύξηση της μετατόπισης του στον πυρήνα (Zrelli et al., 2011). Μελέτη *in vivo* πρότεινε ότι η HT αυξάνει την έκφραση Nrf2 και επάγει την έκφραση ενός γονιδίου στόχου Nrf2 HO-1 (Zheng et al., 2015) (Angeloni, Malaguti, Barbalace, & Hrelia, 2017). Σε άλλη μελέτη σε κύτταρα του καρδιακού ενδοθηλίου που χορηγήθηκε HT υπήρχε αύξηση των επιπέδων της οξυγενάσης 1 της αίμης (HO-1), την οποία οι συγγραφείς απέδωσαν στη δράση του Nrf2. Αποδείχθηκε ότι η HT ενεργοποιήσει τον Nrf2 μέσω των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2. (Rafehi, Ververis, & Karagiannis, 2012) (Martin et al., 2010). Για την τυροσόλη έχει δειχθεί σε πειράματα *in vivo* ότι ενισχύει την ενεργοποίηση του Nrf2 μονοπατιού με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και οδηγεί στην αύξηση έκφρασης του HO-1 αντιοξειδωτικού γονιδίου, που εξαρτάται από τον Nrf2 (Wang et al., 2017).

Η HT έχει διπλή δράση στην αντιοξειδωτική άμυνα τόσο ως παράγοντα δέσμευσης ελεύθερων ριζών όσο και ως ενεργοποιητής του Nrf2. Αυτό υποδεικνύει την πιθανή φαρμακευτική χρήση της HT για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την οξειδωτική βλάβη όπως οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Peng et al., 2015).



Εικόνα 24 Μηχανισμοί και δράσεις HT στο κύτταρο

Επίσης, στην κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε πως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του OLE38, τα επίπεδα της GSH αυξάνονταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, σε αντίθεση με το OLE17, στο οποίο δεν παρατηρήθηκε αυτό.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα για τη GSH, τα επίπεδα των ROS δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Τα επίπεδα ROS που μετρήθηκαν με αυτή τη μέθοδο αντικατοπτρίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS αφού δεν προστέθηκε κάποιος εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είναι σε συμφωνία καθώς έχουν διαπιστώσει ότι τα επίπεδα ROS δεν συνοδεύονται πάντοτε από μεταβολές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες ή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Kerasioti et al., 2014)(Goutzourelas et al., 2014)(Kouka et al., 2017).

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα στο σύνολο τους έδειξαν πως τα δύο πολυφαινολικά εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική και DNA προστατευτική δράση και φάνηκε να βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας.

Ωστόσο, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εκχυλισμάτων, προκύπτει ότι τα δυο εκχυλίσματα έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση, όπως φαίνεται στις *in vitro* τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν. Ωστόσο το OLE17 είναι ισχυρότερο ως προς την ικανότητα να προστατεύει το DNA από βλάβη, όπως έδειξε η δοκιμή με πλασμίδιο. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στις δοκιμές σε κυτταρικές σειρές παίζει ρόλο κυτταρικός μεταβολισμός, που επηρεάζει τη δραστηριότητα των δυο εκχυλισμάτων, κάτι που μπορεί να αποτελεί εξήγηση για τη διαφορά στη δράση τους.

Από την συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων, φάνηκε πως το OLE17 προστατεύει πιο αποτελεσματικά το πλασμίδιο στα *in vitro*, κάτι που πιθανώς να οφείλεται στην περίσσεια υδροξυτυροσόλης που περιέχει. Αντίθετα, στις δοκιμές σε κυτταρικές σειρές φαίνεται πως ο μεταβολισμός προκαλεί την δημιουργία πιθανών μεταβολιτών με διαφορετική δράση. Το εκχύλισμα OLE 38 το οποίο έχει περίσσεια τυροσόλης έχει την ικανότητα να προκαλεί μεγαλύτερη επαγωγή στην έκφραση της GSH. Μέσω της μελέτης αυτής έγινε μια εκτίμηση για την σχέση χημικής δομής και αντιοξειδωτικής δράσης για τις δύο υπό μελέτη πολυφαινόλες του ελαιολάδου, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση του μοριακού μηχανισμού που ευθύνεται για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Καθώς, όπως ήδη έχει αναφερθεί, κύριο ρόλο στην περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πολυφαινόλες, κατέχουν οι καλλιεργητικές πρακτικές, η συγκομιδή, ο τρόπος παραγωγής και αποθήκευσης του ελαιολάδου, κύριο μέλημα της μελέτης αυτής είναι, έπειτα από την ανεύρεση του πιο ισχυρού εκχυλίσματος, να γυρίσουμε πίσω στο χωράφι έτσι ώστε να καταγραφούν οι καλλιεργητικές πρακτικές. Στόχος είναι να δημιουργηθεί μια κοινή καλλιεργητική πορεία, που θα επιφέρει την παραγωγή ελαιολάδων με υψηλή προστιθέμενη αξία.

Μελλοντικά, παρόμοιες μελέτες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην ανάδειξη της βιολογικής αξίας των ελληνικών ελαιολάδων και στην κατηγοριοποίηση τους με βάση τα επιμέρους συστατικά του πολυφαινολικού τους περιεχομένου. Επόμενα βήμα θα μπορούσε να είναι η τυποποίηση αυτών των ελαιολάδων και η εξαγωγή τους στην παγκόσμια αγορά.

Βιβλιογραφία

- Angeloni, C., Malaguti, M., Barbalace, M. C., & Hrelia, S. (2017). Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18112230>
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>
- Bayram, B., Ozcelik, B., Grimm, S., Roeder, T., Schrader, C., Ernst, I. M. A., ... Rimbach, G. (2012). A Diet Rich in Olive Oil Phenolics Reduces Oxidative Stress in the Heart of SAMP8 Mice by Induction of Nrf2-Dependent Gene Expression. *Rejuvenation Research*, *15*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1245>
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2006). Molecular and cellular targets. In *Molecular Carcinogenesis* (Vol. 45, pp. 422–430). <https://doi.org/10.1002/mc.20222>
- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms11020458>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., ... Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., ... Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, *33*(11), 1099–1112. <https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
- Guo, W., An, Y., Jiang, L., Geng, C., & Zhong, L. (2010). The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.2943>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1–85.
- Hamzaoui, M., Renault, J. H., Reynaud, R., & Hubert, J. (2013). Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.07.024>
- Kitsati, N., Mantzaris, M. D., & Galaris, D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.006>

- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinou, N., ... Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 703–712. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
- Kountouri, A. M., Mylona, A., Kaliora, A. C., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*, 14(10), 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.06.001>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., & Zappia, V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01350-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01350-8)
- Martin, M. A., Ramos, S., Granado-Serrano, A. B., Rodriguez-Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/ protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900159>
- Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., & de la Torre, R. (2017). Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants*, 6(4), 73. <https://doi.org/10.3390/antiox6040073>
- Miro-Casas, E., Covas, M. I., Farre, M., Fito, M., Ortuno, J., Weinbrenner, T., ... De La Torre, R. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49(6), 945–952. <https://doi.org/10.1373/49.6.945>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Peng, S., Zhang, B., Yao, J., Duan, D., & Fang, J. (2015). Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food Funct.*, 6(6), 2091–2100. <https://doi.org/10.1039/C5FO00097A>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804252105>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative

- stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 194586.
<https://doi.org/10.1155/2011/194586>
- Rafehi, H., Ververis, K., & Karagiannis, T. C. (2012). Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. *Journal of Dietary Supplements*.
<https://doi.org/10.3109/19390211.2012.682644>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidativestressinaginghumanskin. *Biomolecules*, 5(2), 545–589.
<https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Sacchi, R., Paduano, A., Savarese, M., Vitaglione, P., & Fogliano, V. (2014). Extra virgin olive oil: From composition to “molecular gastronomy.” *Cancer Treatment and Research*, 159, 325–338. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_19
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S–85S.
<https://doi.org/10.1089/109662000416311>
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*.
<https://doi.org/10.1079/NRR200495>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Freeradicals, metalsandantioxidantsinoxidativestress-inducedcancer. *Chemico-Biologicalinteractions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01216-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01216-3)
- Wang, W.-C., Xia, Y.-M., Yang, B., Su, X.-N., Chen, J.-K., Li, W., & Jiang, T. (2017). Protective effects of tyrosol against LPS-induced acute lung injury via inhibiting NF-κB and AP-1 activation and activating the HO-1/Nrf2 pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 583–593.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00756>
- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., & Gaforio, J. J.

- (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu3100839>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, *54*, 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Zheng, A., Li, H., Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., ... Feng, Z. (2015). Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(2), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.006>
- Zhu, L., Liu, Z., Feng, Z., Hao, J., Shen, W., Li, X., ... Liu, J. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.09.006>
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, *26*(3), 151–194.